



Les sous unités spécifiques de l'ARN polymérase I

Frédéric Beckouet

► To cite this version:

Frédéric Beckouet. Les sous unités spécifiques de l'ARN polymérase I. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT: . tel-00553144

HAL Id: tel-00553144

<https://theses.hal.science/tel-00553144>

Submitted on 6 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE d'ORSAY

THESE

Présentée

Par

Frédéric BECKOUËT

Pour obtenir

**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES DE
l'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

Ecole doctorale « Gènes, Génomes, Cellules »

Le 28 Septembre 2007

Sujet : Les sous-unités spécifiques de l'ARN polymérase I

Mme Monique BOLOTIN-FUKUHARA

Président

Mr Patrick SCHULTZ

Rapporteur

Mr Denis LAFONTAINE

Rapporteur

Mr Olivier GADAL

Examineur

Mr Raymond WATERS

Examineur

Mr Pierre THURIAUX

Directeur de thèse

UNIVERSITE DE PARIS XI
UFR SCIENTIFIQUE d'ORSAY

THESE

Présentée

Par

Frédéric BECKOUËT

Pour obtenir

**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES DE
l'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

Ecole doctorale « Gènes, Génomes, Cellules »

Le 28 Septembre 2007

Sujet : Les sous-unités spécifiques de l'ARN polymérase I

Mme Monique BOLOTIN-FUKUHARA

Président

Mr Patrick SCHULTZ

Rapporteur

Mr Denis LAFONTAINE

Rapporteur

Mr Olivier GADAL

Examineur

Mr Raymond WATERS

Examineur

Mr Pierre THURIAUX

Directeur de thèse

A ma mère

REMERCIEMENTS

C'est terminé ! C'est drôle de regarder derrière soi et de faire le bilan d'une partie de sa vie. Ces années passées au SBGM (ou iBitec !) ont été enrichissantes à tous les points de vue. Elles m'ont permis de rencontrer des gens formidables que je souhaite saluer.

Tout d'abord je remercie Monsieur Denis Lafontaine, Monsieur Patrick Schultz, Monsieur Olivier Gadal, Monsieur Raymond Waters et Madame Monique Bolotin Fukuhara, d'avoir accepté d'être membres de mon jury.

Bien entendu, je remercie Michel Werner et André Sentenac de m'avoir accueilli dans le service de Biochimie et de Génétique Moléculaire (SBGM) du CEA de Saclay.

Je remercie ensuite du fond du cœur Pierre de m'avoir encadré pendant mon année de DEA et ces quatre années de thèse. Je sais, Pierre, c'est le moment de partir ☺ ! Ce fut un plaisir d'apprendre auprès de toi. Merci de tes conseils, de tes critiques, de ta patience (il en fallait !!!) et du temps que tu as pu m'accorder.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer, pendant ma thèse, deux séjours dans le Laboratoire de Raymond Waters à Cardiff. Je tiens à remercier Raymond Waters de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et Yumin Teng de m'avoir encadré pendant ces séjours. Je remercie également tous les autres membres du laboratoire.

Je tiens à remercier les organismes « Entente Cordiale » et EMBO pour les financements de mes séjours à Cardiff. Je remercie également l'Association pour la Recherche contre le Cancer de m'avoir octroyé un financement pour la réalisation de ma quatrième année de thèse.

Merci aux membres actuels et anciens du laboratoire Thuriaux/Werner. Merci tout particulièrement à Sylvie qui m'a accompagné avec sympathie. Je te remercie pour ta bonne humeur, pour la qualité expérimentale de ton travail, mais surtout pour la qualité de tes pâtisseries (elles aussi vont me manquer !). Je suis désolé d'avoir accaparé le Mac pendant la rédaction de cette thèse.

Pendant mon stage de DEA, j'ai eu la chance de bénéficier d'un guide. Eléna, je te remercie de ta bonne humeur, du temps que tu m'as consacré pour ces discussions scientifiques fort intéressantes. Merci également d'avoir tenté de m'initier à la vodka !!!

Un grand merci à Cécile Zaros, le pinson du laboratoire que j'ai eu le plaisir de côtoyer lors de ma première année de thèse.

Merci à Daphné pour sa disponibilité, sa gentillesse à toute épreuve et pour les multiples services rendus.

Merci à Max que j'ai eu le plaisir de connaître à Namur et de retrouver à Paris. Allez, Max, une dernière : « té ni dé sé en diden en casrol glo cho, ion di fout i ka fê cho issi la lot la répon : ha en zé ka palé » Merci mon petit « Maxilase » d'être comme tu es.

J'ai passé ma dernière année de thèse en compagnie d'un concentré de gentillesse, de sagesse et de diplomatie venant tout droit de Pologne (ou d'Ussel !). Je te remercie, Marta.

De l'autre côté il y avait Cyrillou ! Comme dirait quelqu'un : « Nous sommes arrivés ensemble au laboratoire et nous terminons ensemble ». J'ai également passé de chouettes années en ta compagnie au laboratoire. J'espère que l'on se reverra en Grande-Bretagne. Merci, Julie, pour le temps que tu m'as accordé lorsque j'avais besoin de conseils techniques.

Un grand merci à Claire pour les multiples services rendus (porte-bébés, ticket de spectacle, café etc.)

Merci Yaf, pour ta sympathie. Je te remercie également de m'avoir régulièrement conduit à la station du Guichet.

Merci à Mehdi pour son esprit critique, sa bonne humeur et surtout pour son humour inoubliable !

Sylviaïn (Monsieur ouille ouille !!!), je te remercie de ces grands moments de détente.

Merci également à Gwenaël, Delphine, Nicolas, Benjamin et Gabrielle d'avoir animé la vie de notre équipe.

Parmi les incontournables du service il y a bien sur :

Michel Riva. Michel, tu ne vas plus entendre ces requêtes : « Michel aurais-tu des anticorps anti-A190, anti-A49, anti-A34, anti-Rp65, anti-A135, des anticorps anti-Pol I. J'oubliais de la Pol I purifiée! » Encore merci pour ces services qui ont contribué largement à l'avancée de ma thèse.

Lynda je te remercie pour ces discussions « interminables....

Un grand merci à Arlette (c'est 11H30, on va manger!), indispensable au bon fonctionnement du service.

Olivier et Danuta merci pour ce voyage en Californie. J'en garde un bon et grand souvenir : on s'est bien amusés ! C'était très intéressant ! Olivier, je te remercie également de ta disponibilité et de tes bons conseils.

Christian, je te remercie pour toutes ces histoires que tu m'as relatées chaque fois que je te croisais dans les couloirs du service.

Un grand merci à Christophe, toujours d'attaque pour discuter d'expériences culinaires.

Merci au clan de la « bière session » : Benoît, en ce moment, tu dois être aux anges car la France vient de vaincre les All Blacks. Je te remercie de ta sympathie et de ta simplicité. Je remercie Nayla de sa gentillesse, et de ses histoires très drôles ☺. Nayla, je te remercie également de m'avoir fait part sans réserve de ton travail de recherche. Merci à Willy, notre grand sage du Clan. Encore une fois Monsieur Willy, si tu passes en UK fais-moi un signe. Merci à Camille (sacrée Brochier !) d'avoir animé notre séminaire du vendredi et bien d'autres réunions ! Merci également pour les multiples services rendus. Je souhaite que les US te réussissent. Vivienne, je te remercie pour ta sympathie et pour m'avoir permis de récupérer (il y a deux semaines) mes enfants sans être en retard. Merci également à Emilie et Nicolas pour leur sympathie et leur bonne humeur. J'espère que l'on aura l'occasion de renouveler ces expériences en dehors du cadre CEA.

Je remercie les secrétaires Catherine, Chantal, Gisèle et Véronique pour les services qu'elles m'ont rendus tout au long de ma thèse.

Je remercie aussi, Stephan, Peggy, Christian, Sandro, Michel de Caldée, Jean-Marc, Céline, Christophe, Gilles, S², Joël, Sabrina, Audrey, Marie-Claude, Régis, Stéphanie, Anne, Noëlle, Arnaud et Christine pour leur sympathie.

Je ne peux pas nommer toutes les personnes, très nombreuses, qui sont passées ou sont encore au SBGM (ou iBitec !) et avec qui j'ai interagi au cours des quatre années de cette thèse. Je les remercie cordialement.....

Merci à Olivier Gadat d'avoir accepté d'être mon tuteur. Je te remercie également, Olivier, de tes conseils très constructifs.

Je voudrais profiter de l'occasion pour remercier Madame Pulvar, Monsieur Vandenhoute, Monsieur Vanmullem, Madame Bolotin-Fukuhara, et Monsieur Confalonieri qui m'ont donné le goût de la recherche.

Michèle, Andréa et Marta je vous remercie de m'avoir accordé du temps à la correction de ce manuscrit.

Un très grand merci au comité d'organisation de la fête du 28 septembre 2007 : Tony, Pierre, ma mère, Michèle, mon RDE, Nathalie, et Marie-Françoise. Je vous remercie d'avoir été également présents dans d'autres situations.

Un très grand merci à mes parents, ma famille et mes amis qui ont contribué largement à la réussite de cette thèse. Je vous remercie d'avoir toujours été présents de loin ou de près.

Je remercie enfin mes deux petits bonhommes, Maël et Quentin, ainsi qu'Aude, qui embellissent quotidiennement ma vie.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	4
CHAPITRE I : STRUCTURE ET FONCTION DES ARN POLYMERASES EUCARYOTIQUES.....	6
Préambule.....	6
1. Présentation générale des ARN polymérases.....	7
2. Les ARN polymérases de <i>S. cerevisiae</i>	9
2.1. Spécificité transcriptionnelle.....	9
2.2. Clonages des gènes des ARN polymérases.....	10
3. Conservation évolutive.....	12
3.1. L'enzyme minimale.....	12
3.2. Aspects spécifiques des ARN polymérases I, II et III.....	15
4. Organisation spatiale.....	16
4.1. L'ARN polymérase II et ses partenaires.....	16
4.2. L'ARN polymérase I et l'ARN polymérase III.....	22
CHAPITRE II : TRANSCRIPTION DE L'ADNr PAR L'ARN POLYMERASE I.....	26
1. Présentation générale du nucléole et de la biogenèse de ribosome.....	26
Le nucléole.....	26
Biogenèse des ribosomes.....	28
2. Organisation de L'ADNr chez la levure et chez les mammifères.....	31
2.1. L'unité de transcription de l'ARN polymérase I.....	33
3. Le cycle de transcription par l'ARN polymérase I.....	34
3.1. Le complexe de pré-initiation chez <i>S. cerevisiae</i> : Core Factor et UAF.....	36
3.2. Recrutement de l'ARN polymérase I sur le Complexe de pré-initiation :.....	37
3.3. Le complexe de pré-initiation de l'ARN polymérase I chez les mammifères.....	39
Le Facteur SL1/TIF-IB.....	39
UBF.....	40
Quels sont les homologues d'UBF et de SL1/TIF-IB chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ?.....	42
3.4. Elongation.....	44
Rappel sur l'ARN polymérase II.....	44
Quels sont les facteurs d'élongation de l'ARN polymérase I ?.....	45
Spt5-Spt4.....	46
TFIIH.....	47
CSB/Rad26.....	48
Assemblage co-transcriptionnel de la machinerie de maturation des ARNr.....	49
3.5. Terminaison de la transcription.....	51
PARTIE EXPERIMENTALE	54
CHAPITRE III : RESULTATS.....	56
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	107
MATERIELS ET METHODES	116
I MATERIELS.....	118
1. Milieux de cultures.....	118
2. Souches et plasmides.....	119
II METHODES EXPERIMENTALES	123
1. Immuno-précipitation chromatinienne.....	123
2. Clonage Gateway™.....	127
3. Immuno-précipitation des protéines.....	128

ANNEXE I	130
BIBLIOGRAPHIE	144

ABREVIATIONS

35S	Précurseurs des ARNr 25S, 18S et 5,8 chez <i>S. cerevisiae</i>
aa	Acides aminés
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
CF	Core Factor
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
NTS	« Non-Transcribe Spacer »
ORF	« Open Reading Frame »
PAF	« Pol I Associated Factor »
PCR	« Protein Chain Reaction »
UAF	« Upstream Activating Factor »
UBF	« Upstream Binding Factor »
TTF-I	« Transcription Terminaison Factor »
TAF	« TBP associated Factor »
TBP	« TATA Binding Protein »
TFIIB	« Transcription Factor of RNA polymerase II, B »
TFIID	« Transcription Factor of RNA polymerase II, D »
TFIIS	« Transcription Factor of RNA polymerase II, S »
TFB	« Archeal Transcription Factor homologous to TFIID »
SL1	« Selectivity factor 1 »
UV	Ultra Violet
TCR	« Transcription Coupled Repair »
NER	« Nucleotide Exision Repair »
GGR	« Global Genomic Repair »
ChIP	Immuno-Précipitation Chromatinienne
ChIP on chip	Immuno-Précipitation Chromatinienne sur puces à ADN

INTRODUCTION

CHAPITRE I : STRUCTURE ET FONCTION DES ARN POLYMERASES EUCARYOTIQUES

Préambule

Au cours de cette thèse j'ai étudié le rôle biologique de deux sous-unités polypeptidiques de l'ARN polymérase I de levure, les protéines Rpa49 et Rpa34. La principale conclusion de ce travail est que celles-ci forment un hétérodimère ancré spécifiquement à l'ARN polymérase I. Cette structure joue un rôle crucial, bien que non strictement essentiel, dans la transition fonctionnelle entre le recrutement de l'ARN polymérase I sur l'ADN ribosomique (ADNr) et le démarrage de la transcription proprement dite.

Cette étude a été réalisée chez la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*, un eucaryote unicellulaire appartenant au groupe des champignons ascomycètes. Les champignons sont eux-mêmes assez proches des animaux avec qui ils forment le phylum des unikontes. La levure est donc un excellent modèle d'étude des cellules animales, mais aussi des cellules eucaryotes en général. Il existe d'ailleurs deux protéines homologues à Rpa49 et Rpa34 chez les mammifères.

Dans les deux chapitres introductifs, je partirai systématiquement du modèle levurien (*S.c*) de la transcription en le comparant à celui des mammifères, même si la diversité biologique des eucaryotes va bien au-delà de ces deux groupes. Je présenterai d'abord les ARN polymérases eucaryotiques (Chapitre I) puis je décrirai plus en détail le mécanisme de la transcription par l'ARN polymérase I (Chapitre II). Les chapitres III et IV comporteront l'essentiel de mes résultats expérimentaux. Une annexe présentera des résultats, obtenus en marge de ma thèse, sur la découverte de l'homologue archéen de la sous-unité Rpb8 qu'on croyait être typiquement eucaryotique.

1. Présentation générale des ARN polymérases

C'est dans les cellules de mammifères qu'a été découverte, il y a près d'un demi siècle, l'existence d'une activité ARN polymérase ADN dépendante (Weiss 1959). Cette nouvelle activité enzymatique était prédite par les notions alors toutes nouvelles de transcription et d'ARN messenger, qui postulaient que tous les ARN sont la copie fidèle d'un brin complémentaire de l'ADN, et qu'il doit donc exister une ARN polymérase dans tous les organismes cellulaires.

L'ARN polymérase a d'abord été surtout étudiée dans le modèle bactérien (*Escherichia coli*). Ces études ont montré une enzyme de grande taille (0.5 MDa), faite d'une « core enzyme » catalytique de structure $\alpha_2\beta\beta'\omega$, se combinant à une famille de facteurs σ assurant la reconnaissance des promoteurs (Chamberlin 1962; Zhang et al. 1999). On la retrouve également dans les chloroplastes (Tableau 1). La situation est plus complexe chez les eucaryotes puisque, dix ans après la découverte de Weiss et Gladstone, Roeder et ses collègues ont séparé l'activité humaine en trois fractions protéiques distinctes (Roeder and Rutter 1969; Novello and Stirpe 1970) dont l'une, localisée dans le nucléole, est l'ARN polymérase I. Dans le même temps, C. Kedinger et ses collaborateurs distinguaient trois enzymes (Kedinger et al. 1970) sur la base de la sensibilité à l' α -amanitine. Depuis, trois formes d'ARN polymérases nucléaires ont été bien caractérisées chez la levure, et identifiées dans les cellules animales et végétales (Sentenac 1985). Une étude bio-informatique récente montre que les grandes sous-unités de ces trois enzymes sont codées par des gènes paralogues dans l'ensemble des génomes eucaryotes actuellement séquencés (Proshkina et al. 2006) et que l'existence des trois systèmes nucléaires de transcription est une propriété générale de tous les eucaryotes. De nombreux virus à ADN ayant leur propre système de transcription ont également une ARN polymérase, qui ressemble aux polymérases eucaryotes mais avec une composition sous-unitaire simplifiée (Tableau 2).

On a récemment identifié chez les plantes une quatrième ARN polymérase, spécialisée dans l'extinction génétique (Herr et al. 2005; Onodera et al. 2005; Pontier et al. 2005). Enfin, chez les archées, il n'y a qu'une seule forme d'ARN polymérase, comme chez les bactéries, mais sa composition sous-unitaire ressemble fortement à celle des trois enzymes eucaryotiques (Huet et al. 1983; Langer et al. 1995, Kwapisz et al. Soumis pour publication) (Tableau 1, Annexe 1).

Tableau 1 : Classification des sous-unités des ARN polymérases.

Bactéries, chloroplastes		<i>S. cerevisiae</i>			
		Archées	Pol II	Pol I	Pol III
Cœur bactérien	β	A'/A''	Rpb1	Rpa190	Rpc160
	β'	B'/B''	Rpb2	Rpa35	Rpc128
	α	D	Rpb3	Rpc40	Rpc40
	α	L	Rpb11	Rpc19	Rpc19
	ω	K	Rpb6	Rpb6	Rpb6
Archées et eucaryotes		F	Rpb4	Rpa14	Rpc17
		H	Rpb5	Rpb5	Rpb5
		E'	Rpb7	Rpa43	Rpc25
		M/TFIIS	Rpb9	Rpa12	Rpc11
		N	Rpb10	Rpb10	Rpb10
		P	Rpb12	Rpb12	Rpb12
		G	Rpb8	Rpb8	Rpb8
Sous-unités spécifiques				Rpa34	Rpc31
				Rpa49	Rpc34
					Rpc37
					Rpc53
					Rpc82

Tableau 2 : Conservation des sous-unités d'ARN polymérase chez les virus à ADN.

Mimi : Mimivirus, AFSV : African Swine Fever Virus, EHV 86 : Emiliania Huxleyi Virus 86, CIV : Chilo Iridescent Virus, Baculo : Baculovirus.

	TBP	TFIIB	TFIIS	SOUS-UNITES DE POLYMERASE						
mimi	+	+	+	Rpb1 Rpb2 Rpb3	Rpb5	Rpb6			Rpb11	
AFSV	-	+	+	Rpb1 Rpb2 Rpb3	Rpb5	Rpb6	Rpb7		Rpb10	Rpb11
EHV 86	-	-	+	Rpb1 Rpb2 Rpb3	Rpb5	Rpb6			Rpb10	Rpb11
CIV	-	+	+	Rpb1 Rpb2	Rpb5				Rpb10	
vaccine	-	-	+ (Rpo30)	Rpo1 Rpo2 Rpo35	(Rpo22)		Rpo18		Rpo7	
Baculo	-	-	+	(Lef9) (Lef8)						
Polymérase II	+	+	+	Rpb1 Rpb2 Rpb3	Rpb5	Rpb6	Rpb7	Rpb8	Rpb10	Rpb11

Dans la suite de ce travail, le terme « ARN polymérase » désigne uniquement la classe des ARN polymérases hétéromultimériques à laquelle appartient l'ARN polymérase I. Il existe cependant un second type d'ARN polymérases, assurant la transcription de l'ADN mitochondrial dans l'immense majorité des eucaryotes, contribuant à la transcription chloroplastique et intervenant également dans certaines transcriptions phagiques. Cette enzyme est monomérique et a été bien étudiée dans le cas du phage T7 (Cheetham and Steitz

2000). Elle ne présente aucun rapport de structure avec la classe majoritaire des ARN polymérases qui nous intéresse ici, tout en assurant la même fonction catalytique. La comparaison de ces deux classes d'enzymes, très intéressante en soi, sort du cadre de cette introduction.

2. Les ARN polymérases de *S. cerevisiae*

2.1. Spécificité transcriptionnelle

La première caractérisation des ARN polymérases de levure a suivi de peu celle des ARN polymérases des cellules humaines (Sentenac and Hall 1982). Les études biochimiques, génétiques et structurales qui ont suivi ont fait que les trois ARN polymérases de levures sont, de très loin, les mieux caractérisées des ARN polymérases eucaryotes.

L'ARN polymérase I synthétise l'ARNr 35S, précurseur des ARN ribosomaux (ARNr) 25S, 18S et 5,8S. Elle est nucléolaire et constituée de 14 sous-unités dont deux lui sont spécifiques (Tableau 1). Cette spécialisation de l'ARN polymérase I existe probablement chez la majorité des eucaryotes. Cependant, les kinétoplastides échappent à cette spécialité transcriptionnelle. En effet chez les trypanosomes, l'ARN polymérase I transcrit sous forme polycistronique des gènes codant des protéines de surface, la VSG et la procycline (Gunzl et al. 2003).

L'ARN polymérase II synthétise les précurseurs des ARN messagers (ARNm) codant les protéines et la très grande majorité des petits ARN nucléaires (ARNsn) et nucléolaires (ARNsno) stables et non traduits. Depuis peu, on sait aussi qu'elle assure la synthèse d'ARN cryptiques, codés par les régions intergéniques (Wyers et al. 2005). L'ARN polymérase II est nucléoplasmique et constituée de 12 sous-unités (Tableau 1).

L'ARN polymérase III synthétise l'ARN ribosomal 5S (ARNr 5S), les ARN de transfert (ARNt) et plusieurs petits ARN nucléaires non traduits (Chedin et al. 1998). L'ensemble des gènes transcrits par l'ARN polymérase III a été identifié par la technique de « ChIP on chip » (Harismendy et al. 2003). L'ARN polymérase III est constituée de 17 sous-unités dont cinq lui sont spécifiques (Tableau 1). Sa localisation nucléoplasmique, ou nucléolaire, est encore controversée : elle doit logiquement être en partie nucléolaire à cause du 5S qui est à proximité de l'ADNr transcrit par l'ARN polymérase I. Cependant ce point n'a

pas été clairement établi. Il est possible que la transcription des autres transcrits de l'ARN polymérase III, comme les ARNt, soit également nucléolaire (Thompson et al. 2003).

En résumé, l'ARN polymérase II transcrit la majorité du génome, suivie par l'ARN polymérase III, alors que l'ARN polymérase I a un transcrit unique. Si l'on considère le pourcentage d'ARN produits dans la cellule, la tendance est inversée avec une contribution de 60 % des transcrits par l'ARN polymérase I (Figure 1). La régulation de l'ARN polymérase I est donc nécessairement un aspect très important du contrôle global de la croissance cellulaire.

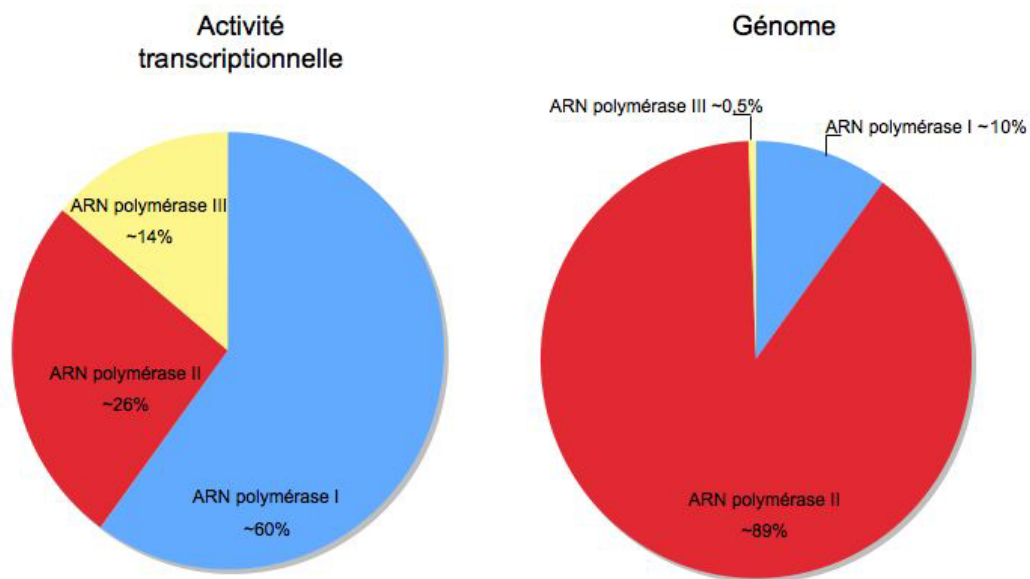


Figure 1 : Représentation de l'activité transcriptionnelle de chaque polymérase.
(Goffeau et al. 1996; Warner 1999).

2.2. Clonages des gènes des ARN polymérases

C'est au début des années 1970 que l'étude des ARN polymérases de levure a débuté véritablement avec l'obtention d'ARN polymérases I, II et III hautement purifiées (Buhler et al. 1974; Huet et al. 1975; Breant et al. 1983). Il a alors été vu que, par rapport à l'ARN polymérase bactérienne dont la composition sous-unitaire est relativement simple ($\alpha 2 \beta \beta' \omega$), les ARN polymérases de levure sont beaucoup plus complexes avec un total de 31 sous-unités (Tableau 2). L'obtention d'anticorps polyclonaux contre ces sous-unités a permis d'établir que Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 et Rpb12 sont communes aux trois ARN polymérases nucléaires, et que Rpc19 et Rpc40, quant à elles, sont communes à l'ARN polymérase I et III (Valenzuela et al. 1976; Buhler et al. 1980; Carles et al. 1991). Une antigénicité croisée entre

les grandes sous-unités de l'ARN polymérase II de *S. cerevisiae* et celles de l'ARN polymérase d'archéobactérie (Huet et al. 1983) a été également observée, indiquant pour la première fois la forte parenté de ces deux enzymes (Langer et al. 1995).

Dans les années 1980, le développement des techniques de génie génétique a rendu possible le clonage des gènes de levure codant pour les sous-unités des ARN polymérases (Young and Davis 1983; Riva et al. 1986). Dans le cas de l'ARN polymérase I qui nous intéresse particulièrement ici, ce clonage a été réalisé par trois approches décrites ci-dessous.

Crible immunologique (Rpa190, Rpa49, Rpa34 Rpa43, Rpa40). Grâce à l'obtention d'anticorps dirigés contre des sous-unités de l'ARN polymérase I, l'équipe de Andre Sentenac et de Michel Riva (Riva et al. 1986) a criblé une banque d'expression de protéines de levure à la surface du phage λ gtII (Young and Davis 1983). Cette approche a permis la caractérisation des gènes codant pour les sous-unités Rpa190 (Memet et al. 1988), Rpa49 (Liljelund et al. 1992), Rpa43 (Thuriaux et al. 1995), Rpa34 (Gadal et al. 1997) et Rpa40 (Mann et al. 1987).

Crible par sonde oligonucléotide (Rpb5, Rpb6, Rpb19, Rpb8, Rpa14, Rpb10, Rpb12). Cette méthode est basée sur le criblage direct d'une banque génomique de levure avec des sondes nucléotidiques réalisées grâce à des informations de séquence peptidique obtenue sur la sous-unité purifiée. Pour l'ARN polymérase I, ces cribles ont permis d'isoler les gènes des sous-unités Rpb5 (Woychik et al. 1990), Rpb6 (Woychik et al. 1990), Rpb19 (Dequard-Chablat et al. 1991), Rpb8 (Woychik et al. 1990), Rpa14 (Smid et al. 1995) Rpb10 (Woychik and Young 1990) et Rpb12 (Treich et al. 1992).

Crible génétique des mutants *rrn* (ribosomic RNA) (Rpa135, Rpa12, Rpa43). Ce crible spécifique de l'ARN polymérase I a été réalisé par l'équipe de Nomura (Nogi et al. 1991a). Il repose sur l'idée que la seule fonction essentielle de l'ARN polymérase I est la synthèse de l'ARNr 35S. Un plasmide réplcatif qui porte un gène codant pour l'ARNr 35S placé sous le contrôle du promoteur inductible du gène *GAL7*. Le gène de l'ADNr est donc transcrit par l'ARN polymérase II en présence de galactose, mais est silencieux en croissance sur glucose. Après une mutagenèse aux UV, des mutants ont été sélectionnés pour leur incapacité à pousser en présence de glucose à température restrictive (36°C). Ces mutants portaient donc des mutations affectant spécifiquement la transcription de l'ADNr. Ils ont été classés en plusieurs groupes de complémentation, dont certains codent pour des sous-unités de l'ARN polymérase I (Rpa135, Rpa43, Rpa12) et d'autres pour des facteurs d'initiation de la transcription (UAF, CF, Rrn3) qui seront détaillés ultérieurement.

3. Conservation évolutive

Une des conclusions importantes tirées des clonages réalisés chez la levure a été que les 12 polypeptides (Rpb1 à Rpb12) de l'ARN polymérase II sont paralogues (ou identiques dans le cas de Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 et Rpb12) à 12 des sous unités des ARN polymérase I et III et ont tous un équivalent chez les archées (Tableau 1). Le tableau 1 présente leur conservation avec les bactéries et les archées (Langer et al. 1995; Werner and Weinzierl 2002; Kwapisz et al. Soumis pour publication). Cinq des sous-unités sont présentes dans tous les organismes cellulaires, y compris chez les bactéries qui forment le core enzyme (α est présente en deux copies identiques) (Murakami and Darst 2003). Rappelons que la reconnaissance des promoteurs bactériens est assurée par la famille des sous-unités σ . Celles-ci n'existent pas chez les archées et les eucaryotes (Lonetto et al. 1992; Murakami and Darst 2003; Mooney et al. 2005), où, le recrutement des ARN polymérases est assuré par des complexes de pré-initiation qui s'organisent autour de la TBP et de son homologue TFA chez les archées.

3.1. L'enzyme minimale

Les polymérases bactériennes, archéennes et eucaryotes ont un ensemble de motifs conservés qui correspondent environ à 25% de la masse totale de l'enzyme (Figure 2). La distribution de ces domaines définit une polymérase minimale qui pourrait correspondre à celle de l'hypothétique ancêtre cellulaire commun aux trois royaumes bactérien, archéen et eucaryotique (LUCA pour Last Undentified Common Ancestor). Cependant un domaine invariant encore plus réduit peut être défini si on prend en compte le cas très curieux des éléments cytoplasmiques à ADN linéaire qu'on trouve dans un petit nombre de levures proches de *Kluyveromyces lactis* (Tommasino et al. 1988; Wilson and Meacock 1988; Schaffrath and Breunig 2000). Ces ADN codent pour un polypeptide (982 acides aminés, 114 kDa dans le cas du pGK2 dans le cas de *K. lactis*) qui résulte manifestement d'une fusion Rpb2 ::Rpb1, suivie d'une importante évolution régressive. On y trouve 14 blocs conservés qui définissent un domaine catalytique minimal commun à toutes les ARN polymérases (Figure 3). La majeure partie de ce domaine correspond à la structure en deux feuillets β . Iyer et al. (2003) ont montré qu'il est probablement partagé avec une classe d'ARN polymérases ARN dépendantes, dont celle impliquée dans la synthèse des micro ARNs. En outre, les motifs NADFGD (liant le Mg (A) et GDKFASRHGQKG de Rpb2 (contactant l'extrémité

3'OH de l'ARN) sont également conservés dans les sous unités Lef8 et Lef9 (Iorio et al. 1998) (Figure 4) des ARN polymérases de baculovirus, qui n'ont en dehors de cela aucune ressemblance avec Rpb1 et Rpb2.

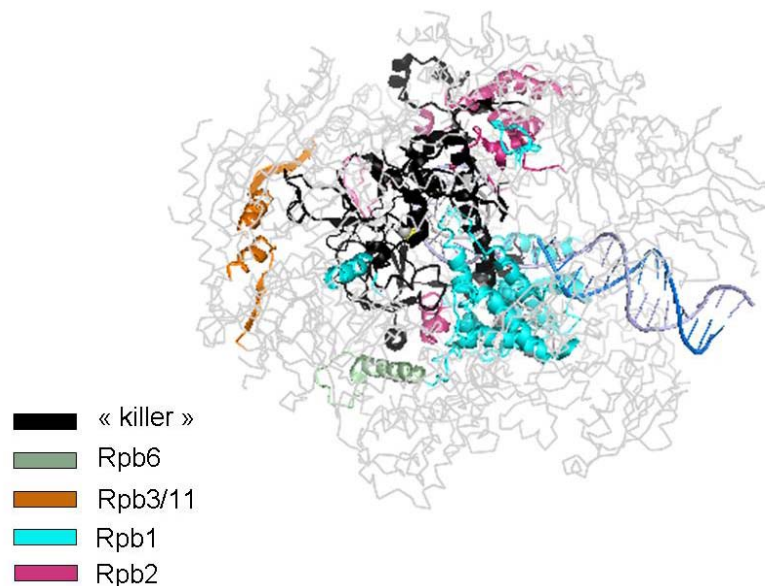


Figure 2 : Représentation des domaines partagés entre l'ARN polymérase eucaryotes et l'ARN polymérase bactérienne. Sur ce schéma sont également mentionnés les domaines partagés avec le plasmide « Killer ». La double hélice de l'ADN entrant dans le canal est en bleu. Construction sur Pymol (<http://pymol.sourceforge.net/>) à partir des coordonnées 2VNZL (PDB) (Bushnell et al. 2004).

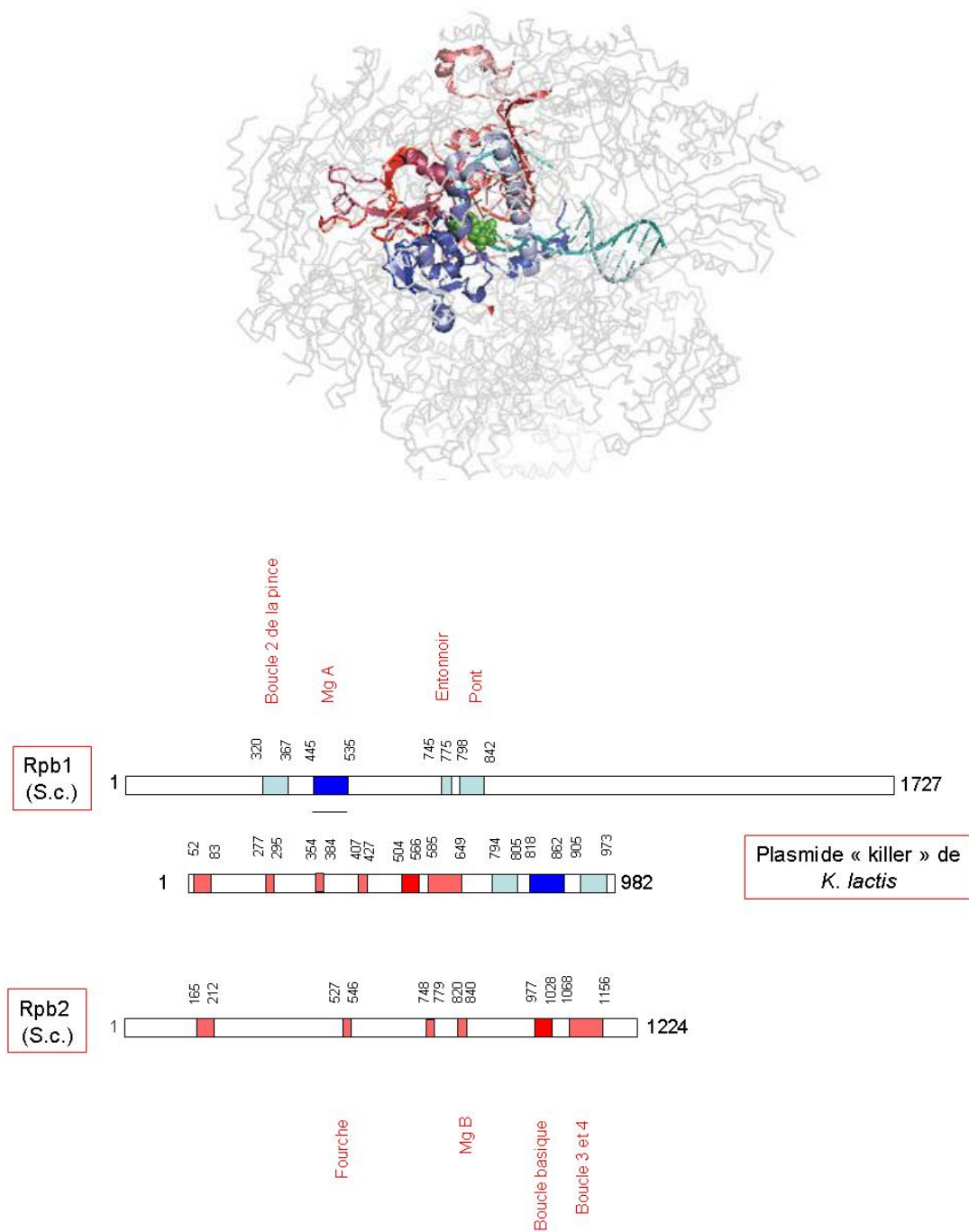


Figure 3 : Représentation des domaines partagés entre le plasmide « Killer » et les sous-unités Rpb1 et Rpb2 de l'ARN polymérase II (Tommasino et al. 1988; Wilson and Meacock 1988) (Pierre Thuriaux, communication personnelle).

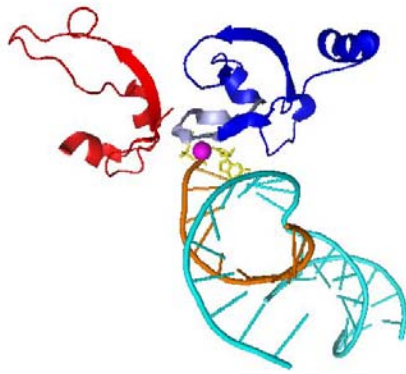


Figure 4 : Structure du site actif commun entre les ARN polymérases eucaryotes et les sous-unités Lef8 et Lef9 des ARN polymérases de baculovirus (Iorio et al. 1998). Le domaine commun avec Rpb2 est représenté en rouge et celui qui est commun avec Rpb1 est représenté en bleu. La double hélice de l'ADN est représentée en bleu pâle ; les nucléotides en jaune ; l'ARNm naissant en orange ; le magnésium en magenta.

3.2. Aspects spécifiques des ARN polymérases I, II et III

Le principal caractère spécifique de l'ARN polymérase II est le domaine C-terminal (CTD) de la plus grande sous-unité Rpb1. Celui-ci est constitué de répétitions heptapeptidiques dont la séquence consensus est YSPTSPS. Le nombre de répétitions varie entre 26 à 27 chez la levure (selon la souche) tandis qu'il est de 52 chez les humains (Allison et al. 1985; Corden et al. 1985). Le CTD n'est pas requis *in vitro* pour l'activité catalytique de polymérisation de l'ARN (Zehring et al. 1988) mais est essentiel à la croissance *in vivo* (Allison et al. 1988). Le CTD semble jouer le rôle d'une plate-forme de recrutement de nombreux facteurs maturant l'ARNm (coiffage, poly-adénylation, épissage). Il est en outre la cible de kinases (dites « CTD kinases ») qui phosphorylent principalement les sérines en position 2 et 5 de l'heptapeptide consensus. La phosphorylation différentielle du CTD au cours d'un cycle transcriptionnel laisse supposer l'existence d'un « code CTD » (Buratowski 2003) où la phosphorylation d'une sérine particulière permettrait le recrutement spécifique d'un facteur donné (Buratowski 2003).

L'ARN polymérase III possède cinq sous-unités spécifiques réparties en deux groupes. Le premier groupe est celui des sous-unités Rpc82, Rpc34 et Rpc31 qui forment un trimère dans l'enzyme. L'existence de ce trimère a été révélée par des données génétiques montrant qu'une mutation *rpc160-T69N* dans le domaine N-terminal de Rpc160 provoque la dissociation de ces sous-unités (Werner et al. 1992). Ces sous-unités semblent être importantes dans l'initiation de la transcription, car la délétion du domaine C-terminal de Rpc31 provoque un défaut d'initiation (Mosrin et al. 1990; Thuillier et al. 1995). De plus, le facteur d'initiation Brf1 (homologue de TFIIB) s'associe en double-hybride avec la sous-unité Rpc34 (Brun et al. 1997; Ferri et al. 2000).

La mutation *rpc160-T69N* se trouve dans un motif conservé spécifique de l'ARN polymérase III (Proshkina et al. 2006). Ce motif serait donc probablement le point d'ancrage du trimère dans l'ARN polymérase III, ce que confirme une étude structurale récente (Fernandez-Tornero et al. 2007). Le deuxième groupe est composé de l'hétérodimère formé de Rpc53 de Rpc37 (Landrieux et al. 2006). Ces sous-unités interagissent avec Rpc11 et seraient impliquées dans le processus de recyclage de l'ARN polymérase III afin de faciliter la ré-initiation de la transcription (Landrieux et al. 2006). Ces sous-unités spécifiques sont également importantes dans la réponse au terminateur de la transcription, qui chez l'ARN polymérase III se ramène à un motif riche en thymines.

L'ARN polymérase I se distingue par ses sous-unités spécifiques Rpa49 et Rpa34 (Huet et al. 1975; Liljelund et al. 1992; Gadai et al. 1997). Le mutant *rpa34Δ* ne confère quasiment pas de retard de croissance à la cellule alors que *rpa49Δ* a un fort retard de croissance à 25°C, est sensible au mycophénolate et est létal en l'absence du facteur Hmo1 (Liljelund et al. 1992; Gadai et al. 1997; Desmoucelles et al. 2002; Gadai et al. 2002). Cela est en accord avec la conservation de ces sous-unités dans l'évolution. En effet, Rpa49 est fortement conservée chez l'humain alors que Rpa34 ne l'est que faiblement (Hanada et al. 1996; Panov et al. 2006b). La partie expérimentale de ce travail a précisé les rôles de Rpa34 et Rpa49.

4. Organisation spatiale

4.1. L'ARN polymérase II et ses partenaires

Les ARN polymérases sont des complexes de taille élevée (600 kDa), et il a donc été difficile d'obtenir leur structure cristallographique (Tableau 3). L'architecture spatiale de l'ARN polymérase II de levure a, dans un premier temps, été analysée par observation au microscopique électronique de cristaux bidimensionnels formés sur une couche lipidique (Darst et al. 1991; Jensen et al. 1998; Asturias and Kornberg 1999). Par la suite, Roger Kornberg et ses collègues ont obtenu, par cristallographie aux rayons X, la structure atomique partielle sans les sous-unités Rpb4 et Rpb7 (Cramer et al. 2000; Cramer et al. 2001), puis complète (12 sous-unités) de l'ARN polymérase II (Armache et al. 2003). Cette prouesse technique, jointe à la découverte du Médiateur associé à l'ARN polymérase II (Kelleher et al. 1990), a valu au chef de file de ce groupe le prix Nobel de chimie en 2006 (Kornberg 2007).

Différentes structures cristallographiques de l'ARN polymérase II de *S. cerevisiae* ont ensuite été réalisées. Elles comportent l'enzyme en élongation, associée à l'ADN, l'ARN et

un nucléotide triphosphaté (NTP) (Gnatt et al. 2001; Westover et al. 2004b), ou avec les facteurs TFIIB (Bushnell et al. 2004) et TFIIS (Kettenberger et al. 2004). Néanmoins, certaines régions désordonnées de l'ARN polymérase II ne peuvent être déterminées par cristallographie. Ainsi sont absents des structures cristallographiques les extrémités N-terminales de Rpb6 et Rpb12, le domaine C-terminal de Rpb1 (CTD) et quelques boucles courtes et périphériques de Rpb1, Rpb2 et Rpb8.

On a également une première idée, bien qu'encore loin de l'échelle atomique, du complexe formé par l'ARN polymérase II avec son Médiateur (Figure 5B) (Davis et al. 2002), ainsi qu'avec les facteurs TFIIF et TFIIE (Leuther et al. 1996; Chung et al. 2003). Des données structurales assez précises pour le facteur SAGA de levure (Wu et al. 2004) et les facteurs TFIIH et TFIIE humains (Schultz et al. 2000; Jawhari et al. 2006) ont également été obtenues. L'ensemble permet (Figure 5) d'entrevoir la complexité structurale du complexe d'initiation de la transcription en admettant (ce qui loin d'être sûr) que l'ARN polymérase II soit simultanément liée à TFIIH, TFIIE, TFIIB et TBP. A terme, ces données permettront de mieux comprendre comment les ARN polymérases s'associent à leurs différents partenaires au cours du cycle transcriptionnel.

Tableau 3 : Les principales structures des ARN polymérases.

ARN polymérase	Caractéristique	Résolution (Å)	Référence
Bactérienne		3,3 Å	(Zhang et al., 1999)
	Sans Rpb4/Rpb7	2,8	(Cramer et al., 2001)
	Sans Rpb4/Rpb7, avec ADN-ARN en pré-translocation	3,3	(Gnatt et al., 2001)
	Entière	4,2	(Armache et al., 2003)
ARN polymérase II (S.c.)	Avec TFIIS	3,8	(Kettenberger et al., 2003)
	Avec TFIIB	4,5	(Bushnell et al., 2004)
	Sans Rpb4/Rpb7, avec 15 résidus du brin matrice et 10 résidus d'ARN en post-translocation	3,6	(Westover et al., 2004b)
	Idem avec un UTP au site d'addition et le 2 ^{ème} Mg	4,2	(Westover et al., 2004a)
ARN polymérase I (S.c.)	Entière	32	(Bischler et al., 2002)
ARN polymérase III (S.c.)	Entière	17	(Fernandez et al., 2007)

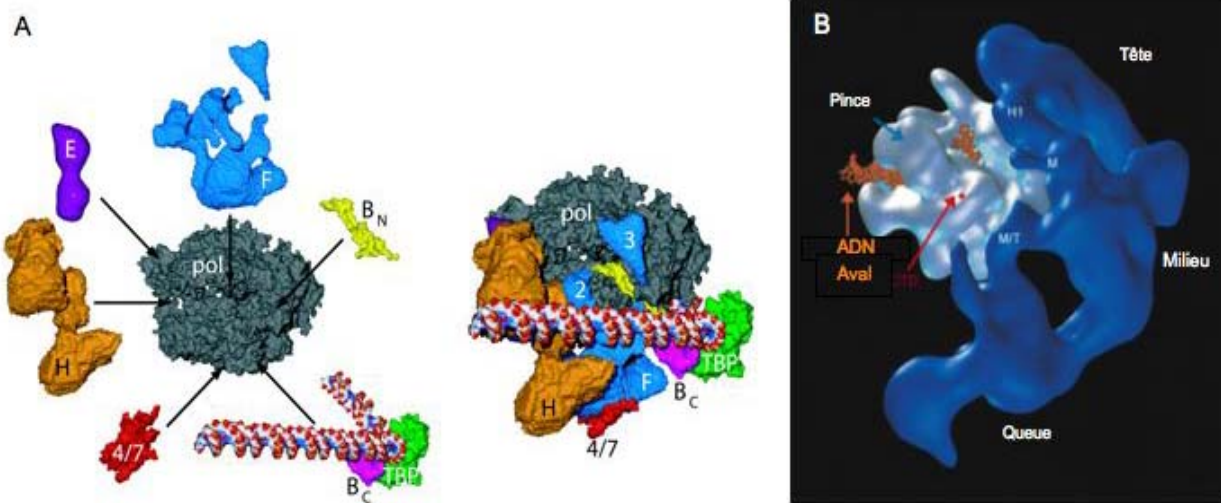


Figure 5 : (A) Structures des facteurs d'initiation associées à l'ARN polymérase II. Modèle illustrant la complexité structurale du complexe d'initiation formé par l'ARN polymérase II (pol) et sa tige Rpb4/Rpb7 (4/7), des facteurs d'initiation TFIIE (E), TFIIF (F), TFIIH (H), TBP et TFIIB (BN et BC, domaines N et C-terminaux) (Bushnell et al. 2004). **(B) Structure de la polymérase II associée au Médiateur.** ARN polymérase II en blanc, englobée par le Médiateur en bleu (Davis et al. 2002).

Les structures cristallographiques de l'ARN polymérase bactérienne de *Thermus aquaticus* (Figure 6B) (Zhang et al. 1999) et de son très proche parent *T. thermus* (Vassylyev et al. 2002) ont été établies à une résolution atomique (3,3 à 2,6 Å). *T. aquaticus* et *T. thermus* sont proches de *Deinococcus radiodurans*, très étudiée pour son extrême radorésistance (Battista et al. 2003; Zahradka et al. 2006). Elles appartiennent à la classe des firmicutes, où se trouve également *Bacillus subtilis*. Les firmicutes sont assez éloignées des protéobactéries comme *E. coli*, dont l'ARN polymérase est évidemment très étudiée biochimiquement et génétiquement, mais pour laquelle il n'existe encore qu'une structure assez peu résolutive.

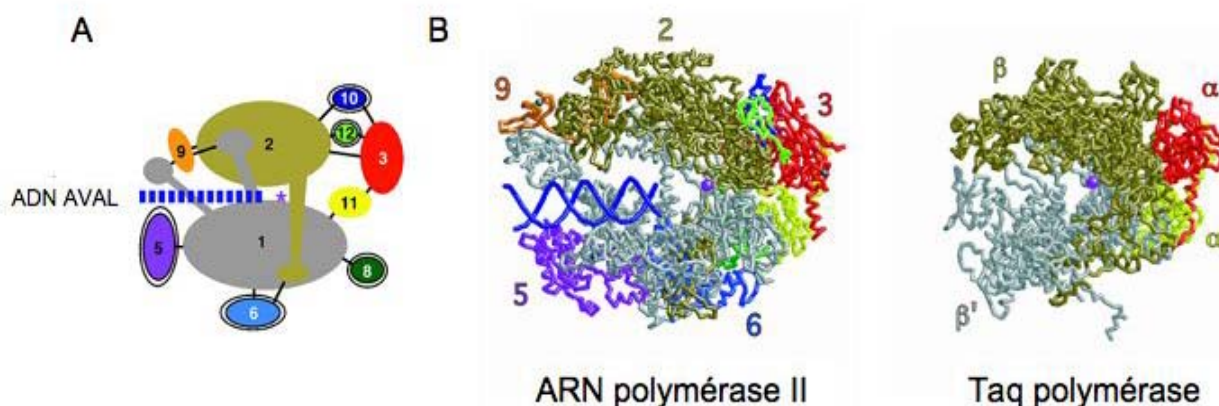


Figure 6 : (A) Schéma des contacts entre les sous-unités de l'ARN polymérase II $\Delta 4/7$. Les sous-unités communes aux trois enzymes eucaryotes sont entourées d'un double cercle. L'astérisque mauve symbolise l'ion Mg^{2+} . **(B) Structure de l'ARN polymérase II $\Delta 4/7$ de *S. cerevisiae* et de l'ARN polymérase de *T. aquaticus*.** La sous-unité ω n'est pas présente sur la structure de l'ARN polymérase de *T. aquaticus*. La position des ions Mg^{2+} est indiquée par la sphère magenta (Geiduschek and Bartlett 2000).

Comme on peut voir à la Figure 6, il existe une bonne conservation entre la forme globale de la structure de l'ARN polymérase de *T. aquaticus* et celle l'ARN polymérase II (Cramer et al. 2000). Comme leurs homologues bactériennes, les deux grandes sous-unités de l'ARN polymérase II, Rpb1 et Rpb2, sont fortement imbriquées l'une dans l'autre. Elles sont maintenues par les sous-unités Rpb3, Rpb11, Rpb10 et Rpb12 qui sont globalement l'équivalent du dimère $\alpha 2$ des bactéries. Deux « mâchoires », peu développées chez les bactéries sont présentes chez l'ARN polymérase II de part et d'autre de l'entrée du canal de 25 Å logeant l'ADN. La mâchoire inférieure est formée du domaine N-terminal de Rpb5, domaine typiquement eucaryote, alors que le domaine C-terminal de Rpb5 est semblable à la sous-unité H des archées (Zaros et al. 2007). La mâchoire supérieure (mâchoire Rpb9) est composée d'une partie de la sous-unité Rpb2 (homologue de β chez la bactérie) et de la sous-unité Rpb9. Cette dernière est composée de deux domaines de zinc, séparée par un linker de 15 résidus. Le domaine N-terminal forme une insertion de feuillets β avec Rpb1, reliant la partie supérieure et inférieure de l'enzyme. Cette liaison jouerait un rôle dans l'ouverture et la fermeture du canal pendant la translocation le long de l'ADN (Cramer et al. 2000).

Le **canal d'ADN** (environ 70 Å de long, du début des mâchoires jusqu'au site actif), est chargé positivement. Compte tenu de sa longueur, environ 20 paires de bases pourraient être engagées dans une enzyme en cours d'élongation (Rice et al. 1993; Cramer et al. 2001).

Un **pont** traverse le canal (hélice $\alpha 25$ de Rpb1) et forme le **pore 1** qui isole la poche catalytique contenant la bulle de transcription et les deux Mg^{2+} catalytiques (Figure 7). Ce pont est conservé dans l'évolution et sa région C-terminale (partie 831-837) est toute proche de l'hybride ADN-ARN formé lors de la transcription. Elle joue probablement un rôle dans la stabilisation de la bulle de transcription durant la translocation de l'ARN polymérase sur l'ADN (Cramer et al. 2001). *In vivo*, cette hélice est interchangeable avec celle de l'ARN polymérase III (Thuillier et al. 1996).

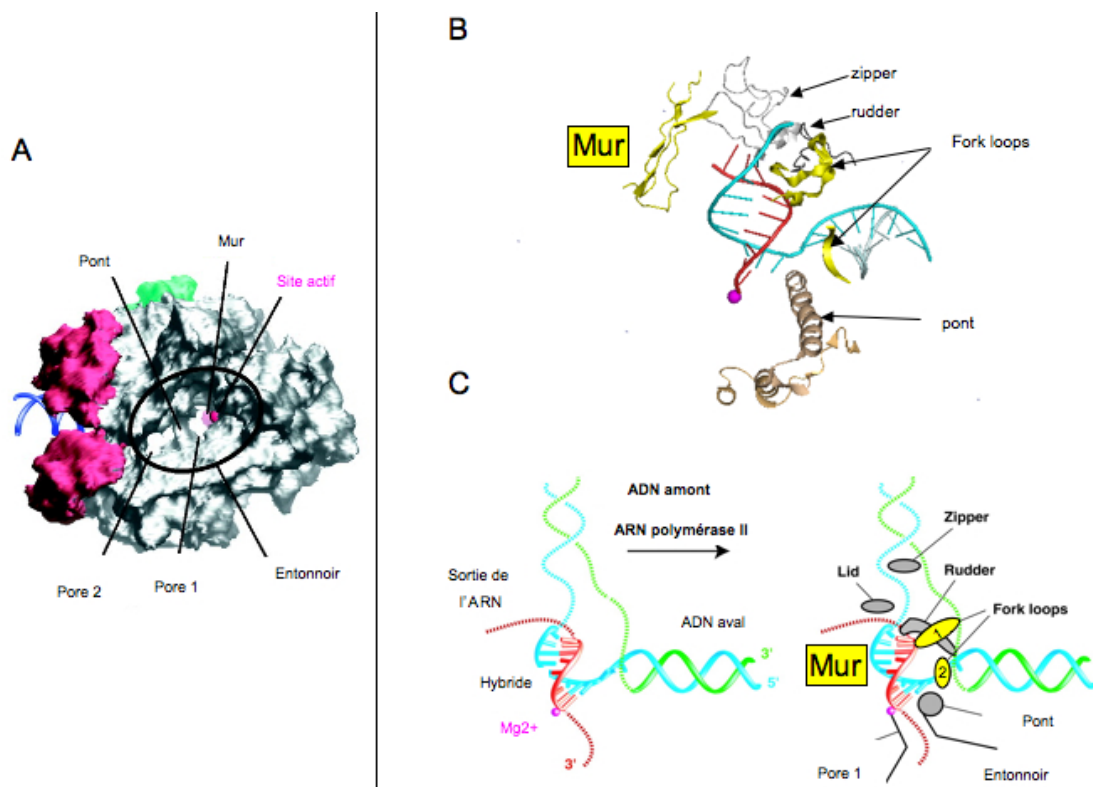


Figure 7 : (A) Représentation des différentes régions de l'ARN polymérase II. Vue de dessous de l'ARN polymérase II sur laquelle est indiqué l'entonnoir. Les deux mâchoires sont colorées en rose et la pince en vert (Cramer et al. 2000). **(B) Structure de l'ARN, de l'ADN et l'hybride ADN-ARN.** Les deux brins d'ADN. Les structures de Rpb1 et Rpb2, impliquées dans le maintien de la bulle de transcription, sont en gris et jaune, respectivement. **(C) Représentation schématique de l'ARN, de l'ADN et l'hybride ADN-ARN, dans l'ARN polymérase en transcription.** Les deux brins d'ADN sont en vert et cyan. L'ARN est en rouge. Pour chaque acide nucléique, les lignes pleines sont issues de la structure cristallographique alors que celles en pointillés indiquent les positions putatives. Les structures de Rpb1 et Rpb2, impliquées dans le maintien de la bulle de transcription, sont en gris et jaune, respectivement (Gnatt et al. 2001).

La poche catalytique maintient l'ADN dans une position ouverte que l'on appelle bulle de transcription (Figures 7B et 7C). Cela serait réalisé par les deux boucles de la fourche Rpb2 (*forks loop*). **La boucle 1** permet de stabiliser la bulle de transcription et d'ouvrir l'ADN en amont, la **boucle 2** agit plus en aval. En effet, le positionnement probable de cette boucle montre qu'elle entre en contact avec le nucléotide + 3, quand celui-ci est apparié au brin d'ADN complémentaire. De plus **le mur** (Rpb2) et **le pont** (Rpb1) interviennent dans l'organisation de l'hybride ADN-ARN. Par ailleurs, deux boucles désordonnées (*lid* et *zipper*) pourraient également interagir avec l'extrémité amont de la bulle (Figure 7B et 7C).

L'entonnoir correspond à l'élargissement des **pores 1 et 2** (de 12 à 30 Å) de l'ARN polymérase II (Figure 7A). Westover *et al.* (2004a) ont proposé qu'il pourrait être accessible aux NTPs, mais Kettenberger *et al.* (2004) ont ensuite montré que TFIIS, le facteur de le clivage de l'ARN polymérase II, occupe entièrement cette voie d'accès hypothétique des NTPs. Cela suggère qu'il y a deux conformations de l'ARN polymérase, une sans TFIIS (compétente pour l'élongation) et une avec TFIIS (compétente pour le clivage). Un modèle alternatif (Figure 8) propose que les NTPs entrent par le canal en accompagnant l'ADN (Nedialkov *et al.* 2003). Dans ce cas, TFIIS pourrait résider en permanence sur l'ARN polymérase II. Enfin, un troisième rôle potentiel de l'entonnoir serait de permettre la sortie des pyrophosphates produits à chaque addition de NTPs.

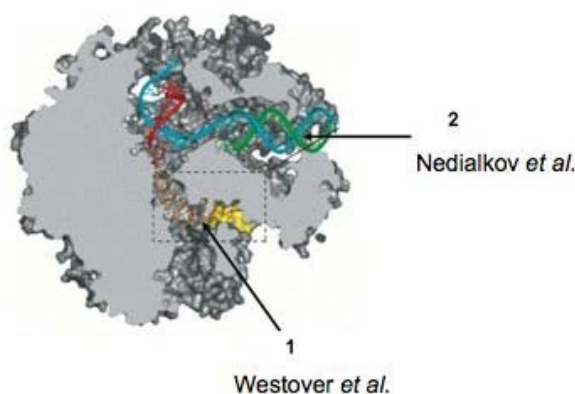


Figure 8 : Propositions pour l'entrée des NTPs dans l'ARN polymérase II. Coupe de l'ARN polymérase en présence de l'hybride ADN-ARN. (1) Selon Westover *et al.* (2007) les NTPs rentrent par l'entonnoir. (2) Selon Westover *et al.* (2004a) les NTPs rentrent par le canal. Les NTPs sont colorés en rose, l'ADN en rouge et l'ARN en bleu. Image tirée de (Westover *et al.* 2004a).

Les ARN polymérases subissent certainement des changements de conformation correspondant à différents états transcriptionnels (recrutement, initiation, translocation). En effet, **trois parties** semblent être mobiles autour du cœur catalytique car elles n'ont pas la même orientation selon les formes cristallines examinées (Figure 9). La première partie (*jaw-lobe* en cyan) formée par la sous-unité Rpb9, un domaine Rpb1 (1141-1275) et Rpb2 (218-405). Le deuxième module mobile (*shelf module*) correspond à la sous-unité Rpb5 et à deux domaines de Rpb1 (résidus 809 -1141 et 1275-1395). Ces deux régions semblent se déplacer de 4 Å contribuant à l'avancée de l'ADN dans le site actif, par un mouvement de rotation (Cramer et al. 2001). Le troisième module, la pince (*clamp*), sert probablement à maintenir l'ADN dans le canal. Elle est formée par Rpb1 et Rpb6 et par la région C-terminale de Rpb2.

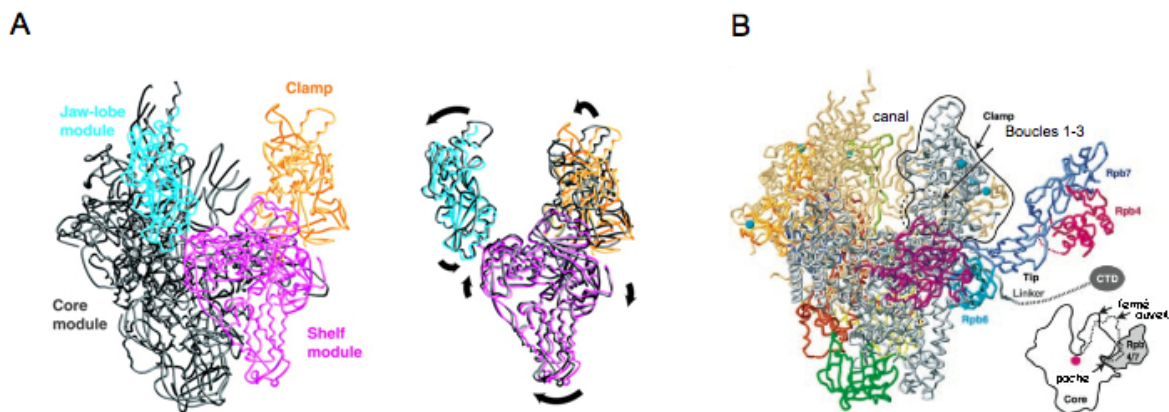


Figure 9 : Représentation des différentes parties mobiles de l'ARN polymérase II $\Delta 4/7$ (A) et de l'ARN polymérase II complète (B) (Cramer et al. 2001; Armache et al. 2003).

Un quatrième module, la tige (*stalk*), formé par les sous-unités **Rpb7-Rpb4** (Armache et al. 2003), est lui aussi potentiellement mobile. Notons que cette structure avait déjà été identifiée sur l'ARN polymérase I (Bischler et al. 2002). Elle est ancrée à la base de la pince entre les sous-unités Rpb6 et Rpb1. Cette structure induirait une fermeture de la pince si l'on compare la structure de l'ARN polymérase sans ou avec Rpb7-Rpb4.

4.2. L'ARN polymérase I et l'ARN polymérase III

En ce qui concerne l'ARN polymérase I et III, il n'y a pas actuellement de structure cristalline complète obtenue par diffraction aux rayons X comparable à celle de l'ARN

polymérase II. Cependant, des structures allant à 16 Å de résolution, obtenues grâce à la microscopie électronique, permettent d'avoir une idée assez précise de l'enveloppe de l'ARN polymérase I et de l'ARN polymérase III (Klinger et al. 1996; Lanzendorfer et al. 1997; Chedin et al. 1998; Bischler et al. 2002; De Carlo et al. 2003; Fernandez-Tornero et al. 2007). En outre, il existe une structure cristallographique détaillée du sous-complexe de l'ARN polymérase III correspondant aux sous-unités Rpc25 et Rpc17 (Jasiak et al. 2006).

La position spatiale de chaque sous-unité sur les structures acquises par la microscopie électronique a été obtenue en combinant deux approches:

- La première consiste à comparer les images obtenues avec l'enzyme d'une part et l'enzyme en présence d'un anticorps dirigé spécifiquement contre une sous-unité d'autre part. La localisation de l'excès lié à la présence de l'anticorps permet de situer sur l'enveloppe tridimensionnelle, la sous-unité décorée par cet anticorps.

- La seconde approche consiste à comparer l'image de l'enzyme complète avec celle d'une enzyme incomplète. Le déficit de densité électronique de la forme incomplète est alors accordé à la sous-unité manquante. Cependant, l'absence d'une sous-unité peut avoir des conséquences non-négligeables sur le repliement ou même la présence des autres sous-unités.

Compte-tenu de la forte conservation des ARN polymérases, les structures spatiales de l'ARN polymérase I et de l'ARN polymérase II (Bischler et al. 2002; Fernandez-Tornero et al. 2007) montrent comme attendu de fortes similitudes avec celle de la structure cristalline de l'ARN polymérase II complète (Armache et al. 2003). Néanmoins, elles présentent des zones supplémentaires qu'il est logique d'attribuer au moins en partie à l'existence des cinq (ARN polymérase III) et des deux (ARN polymérase I) sous-unités qui n'ont pas d'équivalent chez l'ARN polymérase II. Au sein de l'ARN polymérase III, on retrouve ainsi, en avant de la pince (*clamp*) une région attribuée à Rpc82/Rpc34/Rpc31 (Figure 10). Cette position est en bon accord avec les données génétiques qui ont montré qu'une mutation *rpc160-T69N* dans le domaine N-terminal de Rpc160 (équivalent de Rpb1, *clamp core*) induit la dissociation de ces trois sous-unités de l'ARN polymérase III (Werner et al. 1992). Ces sous-unités sont importantes dans l'initiation de la transcription : la délétion du domaine C-terminal de Rpc31 provoque un défaut d'initiation (Mosrin et al. 1990; Thuillier et al. 1995) et Brf1, homologue de TFIIB s'associe en double hybride avec la sous-unité Rpc34 (Ferri et al. 2000). Enfin, la sous-unité Rpc17 appartenant au *stalk* de l'ARN polymérase III interagit à la fois avec Rpc34 et Brf1 (Ferri et al. 2000; Geiduschek and Kassavetis 2001). Il se peut donc que Rpc34 se

positionne près du *stalk* afin d'établir un lien pour Brf1 entre le stalk et le sous-complexe Rpc82/Rpc34/Rpc31.

Une autre zone spécifique de l'ARN polymérase III, positionnée à l'extérieur de la mâchoire supérieure, à coté de Rpc11 (équivalent de Rpb9) est attribuée à Rpc53 et Rpc37 (Figure 10). D'après cette position, ces sous-unités pourraient être un senseur de l'ADN entrant. Cette localisation est en accord avec le rôle de ce complexe dans la reconnaissance du terminateur de la transcription (Landrieux et al. 2006).

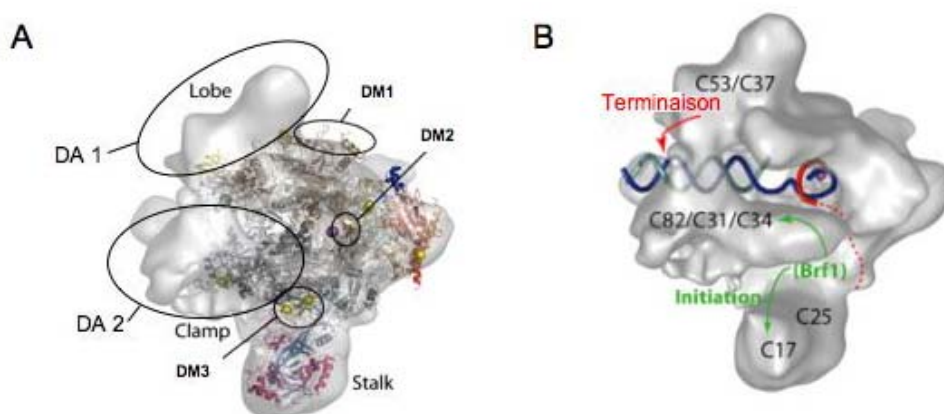


Figure 10 : Représentation spatiale de l'ARN polymérase III. (A) Comparaison de l'enveloppe de l'ARN polymérase III avec la structure cristalline de l'ARN polymérase II. DM pour Domaine Manquant sur l'ARN polymérase III, DA pour Domaine Additionnel. (B) Position des sous-unités spécifiques de l'ARN polymérase III (Fernandez-Tornero et al. 2007).

L'utilisation d'anticorps contre les deux sous-unités spécifiques (Rpa49 et Rpa34) de l'ARN polymérase I a permis de les situer de part et d'autre du canal. Rpa49 est positionnée du côté du *clamp*, près du domaine de fixation de l'ADN (Figure 11). Rpa34, quant à elle, se situe à l'entrée du canal (Bischler et al. 2002). Néanmoins, des données plus récentes (Patrick Cramer, communication personnelle) suggèrent au contraire que ces sous-unités forment un hétérodimère au sein de l'ARN polymérase I. Lors cette étude, l'équipe de Patrick Cramer a utilisé une approche différente qui a consisté à comparer l'image de l'enzyme complète avec celle d'une enzyme dépourvue des sous-unités Rpa49 et Rpa34. Le déficit de densité électronique de la forme incomplète se situant en arrière de la polymérase a été expliqué par les sous-unités manquantes, suggérant ainsi qu'elles s'associent l'une à l'autre. Nous verrons, plus loin que nos données sont également en accord avec cette hypothèse.

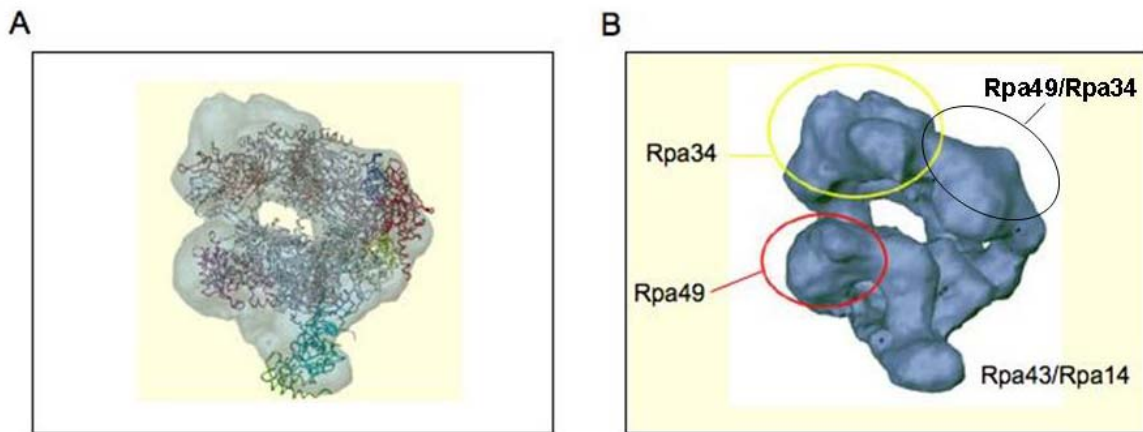


Figure 11 : Représentation spatiale de l'ARN polymérase I. (A) Comparaison de l'enveloppe de l'ARN polymérase I avec la structure cristalline de l'ARN polymérase II (image amicalement communiquée part de P. Schultz). (B) Position des sous-unités spécifiques de l'ARN polymérase I. D'après Bischler *et al.* (2002) les sous-unités Rpa49 et Rpa34 sont de part et d'autre du canal, d'après Khun *et al.* (communication personnelle) Rpa49 et Rpa34 forment un hétérodimère.

CHAPITRE II : TRANSCRIPTION DE L'ADNr PAR L'ARN POLYMERASE I

1. Présentation générale du nucléole et de la biogenèse de ribosome

Le nucléole

Le noyau contient un territoire aisément reconnaissable en microscopie électronique et optique, le nucléole, déjà connu des cytologistes au 19^e siècle. On sait aujourd'hui que le nucléole est le siège de la biogenèse des ribosomes, bien qu'il ait sans doute d'autres fonctions notamment dans la régulation du cycle cellulaire pour sa capacité à séquestrer la phosphatase Cdc14, et dans la maturation des ARNt (Pederson 1998; Bachant and Elledge 1999; Boisvert et al. 2007). Ce n'est pas un organite, car il n'est pas entouré d'une membrane, mais un territoire dynamique à forte concentration en protéines et en ARN, d'où une haute densité photonique et électronique, qui permet de le visualiser aisément. L'observation électronique (Jordan 1984; Thiry et Lafontaine 2005) du nucléole de mammifères met en évidence un empilement concentrique de trois domaines structuraux (Figure 12): On distingue plusieurs centres fibrillaires (CF) entourés de composant fibrillaire dense (CFD, vert). Ces structures sont enchâssées dans le composant granulaire (CG). Les centres fibrillaires contiennent l'ADN et L'ARN polymérase I. La synthèse des transcrits primaires se fait à l'interface entre la zone fibrillaire et la zone fibrillaire dense (Thiry et Lafontaine 2005). Les transcrits naissants s'accumulent dans le composant fibrillaire dense (CDF). La maturation, les modifications des pré-ARN ainsi que l'assemblage des ribosomes se feraient entre le composant fibrillaire dense et le composant granulaire.

La levure est, ici encore, un bon modèle général de la cellule eucaryotique. Thiry et Lafontaine ont cependant suggéré que l'acquisition de la compartimentation tripartite nucléolaire avec un Centre Fibrillaire (CF) est apparue chez les amniotes, donc à une étape tardive de l'évolution animale (Leger-Silvestre et al. 1999; Thiry et Lafontaine 2005). Chez ces derniers l'ADNr contient un très grand espace intergénique entre deux unités de transcription et ces auteurs ont spéculé que ces grands espaces intergéniques organiseraient le Centre Fibrillaire (CF) en un lieu de stockage d'ARN polymérase I.

Une deuxième différence importante avec les cellules de mammifères est due au fait que les champignons ont une « mitose fermée » sans rupture de la membrane nucléaire, alors que celle-ci est détruite (avec disparition apparente du nucléole) à la mitose des cellules animales ou végétales, ce qui suppose un processus de reconstitution du nucléole après la

mitose. Enfin, contrairement aux cellules de mammifères qui contiennent généralement plusieurs nucléoles, une cellule de *S.cerevisiae* contient un nucléole unique formant un croissant gris accolé à la membrane nucléaire (Yang et al. 1989). Cette forme est fortement dépendante de la transcription par l'ARN polymérase I. En effet, l'inactivation de la transcription par l'ARN polymérase conduit à un nucléole très compact (Oakes et al. 1993; Trumtel et al. 2000) (Figure 13).

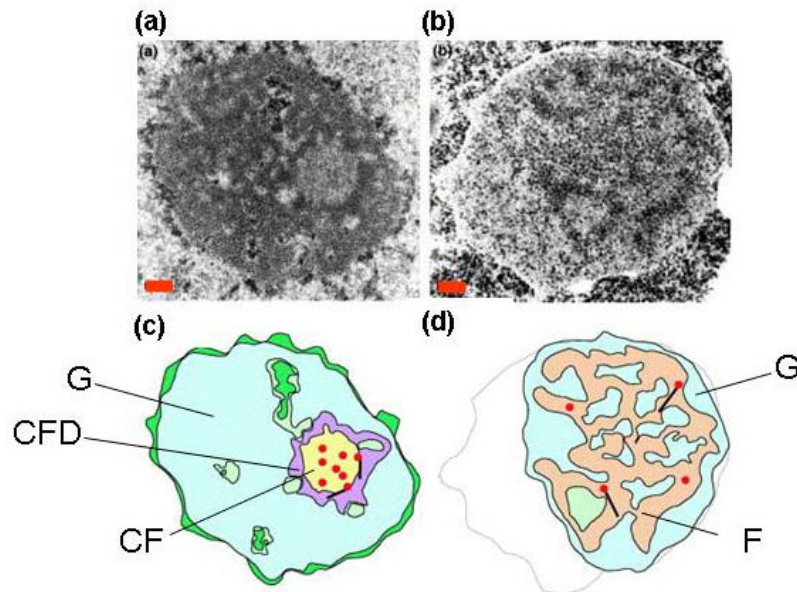


Figure 12 : Organisation nucléolaire de la cellule humaine et de la levure *S. cerevisiae*. L'observation a été réalisée par la microscopie électronique. (A) Nucléole humain. (B) Noyau et nucléole de *S. cerevisiae*. Echelle : 0,2 μ m. (C) et (D) représentation schématique de l'organisation nucléolaire de la levure et de la cellule humaine. F : composant fibrillaire ; FC : centre fibrillaire ; CFD : composant fibrillaire dense ; G : composant granulaire ; l'ARN polymérase I est représentée par le point rouge ; le pré-ARNr 35S est représenté par barre une verticale ; sur la partie (d) l'enveloppe nucléaire est représentée par une ligne grise (Thiry and Lafontaine 2005).

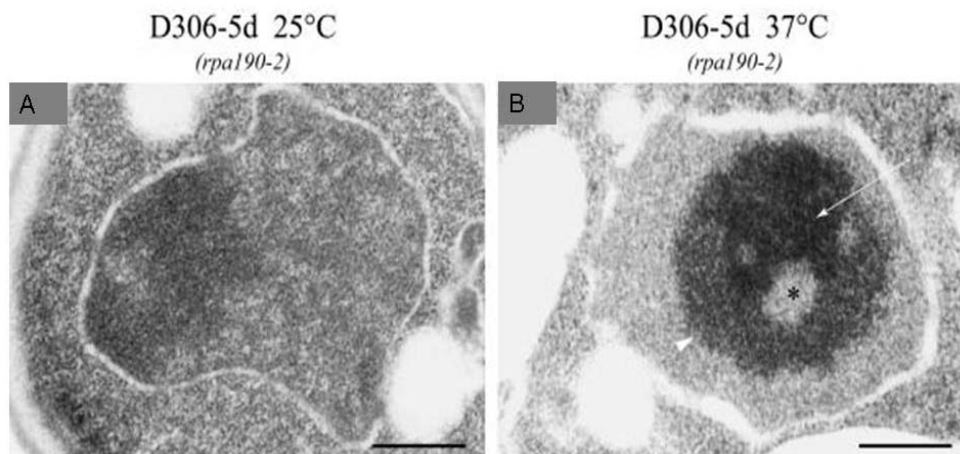


Figure 13 : Analyse en microscopie électronique de l'influence d'une mutation dans Rpa190 (*rpa190-2*) dans la souche D306-5D. Cette mutation confère à la souche un phénotype thermosensible. (A) A 25°C la souche D306-5d porte un nucléole sauvage. (B) Suite à un passage à 37°C le nucléole se décolle de la membrane et devient très compact. Echelle : 300 nm. (Trumtel et al. 2000).

Biogenèse des ribosomes

Rappelons que les ribosomes sont des particules ribonucléoprotéiques de très grande taille (4.2 MDa chez les eucaryotes, 2.5 MDa chez les bactéries) dont la structure atomique a été établie chez les bactéries et les archées (Ban et al. 2000; Yusupov et al. 2001). Les ARNr (5S, 5,8S, 18S, 25S) y occupent environ 50 % de la masse moléculaire. Chez *S. cerevisiae*, l'ARN 18S forme avec 32 protéines (ARNr 16S et 21 protéines chez *E. coli*) la petite sous-unité ribosomique, responsable de l'activité du décodage de l'information génétique. L'ARN 25/28S, 5,8S et 5S ainsi que 46 protéines chez les eucaryotes (ARNr de 23S et 5S avec 34 protéines chez les procaryotes) forment la grande sous-unité qui porte l'activité peptidyl transférase.

Les ribosomes ont une biogenèse largement conservée au cours de l'évolution, où la production des ARN ribosomiques matures requiert une série d'étapes post-transcriptionnelles contrôlées dans le temps et l'espace. Cette maturation a lieu de concert avec l'assemblage de quelque 75 protéines composant le ribosome, elles-mêmes importées depuis le cytoplasme (Figure 14).

Chez les eucaryotes, la biogenèse des ribosomes commence dans le nucléole avec la transcription par l'ARN polymérase I d'un long précurseur (le pré-ARNr 35S chez la levure). Celui-ci contient les séquences des ARNr de 18S, 5,8S et 25S. Ce précurseur va subir un ensemble de modifications ciblées qui font intervenir un grand nombre de snoARN. La

plupart de ces modifications sont des méthylations de l'oxygène en position 2' des riboses et des conversions d'uridines en pseudouridines (Lafontaine and Tollervy 1998). Ce précurseur va aussi être la cible d'une série d'exo et d'endonucléases (à laquelle appartiennent l'exosome et la nucléase MRP) aboutissant à la production des formes matures des ARN ribosomiques de 18S, 5,8S et 25S (Figure 15). La production de l'ARNr 5S est indépendante de la maturation du pré-ARNr de 35S. Il est en effet indépendamment transcrit par l'ARN polymérase III et sa maturation ne semble requérir que l'élimination d'une dizaine de nucléotides à son extrémité 3' (Piper et al. 1983).

Les pré-ARN ribosomiques sont associés dès les premières étapes de la maturation à de nombreuses protéines ribosomiques. De plus ces particules contiennent aussi des enzymes et des protéines chaperonnes requises pour les étapes de modification et/ou de production des ARNr matures, ainsi que pour leur assemblage avec les protéines ribosomiques. Le pré-ARNr 35S associé avec des protéines ribosomiques et non-ribosomiques formerait une particule de 90S (Udem and Warner 1972) (Figure 14). Ce pré-complexe va être ensuite converti en précurseurs des sous-unités de 40S (contenant l'ARNr 18S) et 60S (les ARNr 25, 5,8 et 5S). Les dernières étapes de maturation du pré-complexe de 40S auront lieu dans le cytoplasme alors que le pré-complexe de 60S est majoritairement mûré dans le noyau avant d'être exporté dans le cytoplasme. Les deux sous-unités matures ainsi produites pourront s'associer sur l'ARNm pour former les ribosomes.

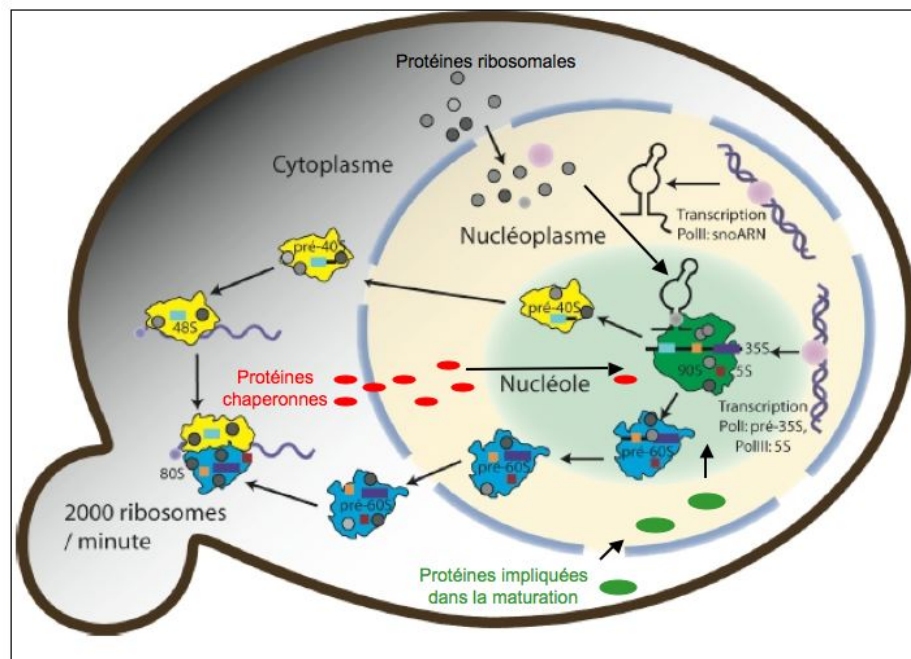


Figure 14: Schéma simplifié de la biogenèse des ribosomes.

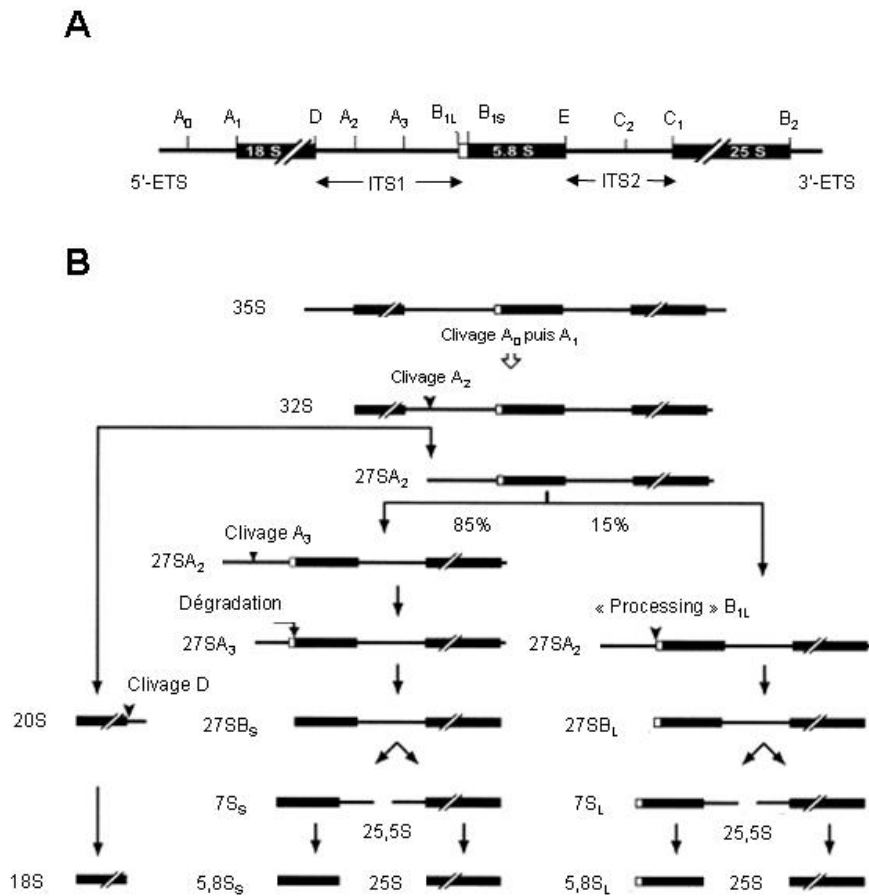


Figure 15 : Les étapes de maturation des ARNr chez *S. cerevisiae*. (A) Pré-ARN ribosomique de 35S. (B) Présentation schématique des étapes de maturation de l'ARNr 35S, précurseur des grands ARNr 25S, 18S et 5,8S. Les rectangles noirs représentent les ARN matures et les lignes matérialisent les séquences espaceur. Les sites de maturation du pré-ARNr sont indiqués. Adapté de (Fromont-Racine et al. 2003).

Une présentation plus détaillée du nucléole et de la biogenèse des ribosomes sort du cadre de cette thèse (Voir Lafontaine and Tollervy 2001), et je me contenterai donc de discuter le couplage entre la transcription et la maturation de l'ARNr auquel participe le processome, une RNP requise pour la production de l'ARNr 18S. Ce complexe se caractérise par la présence du snoARN U3. Ce petit ARN ne semble pas guider la modification des bases mais, agirait comme un ARN guide s'appariant à l'ARNr 35S pour former un pseudonœud qui faciliterait les premiers clivages requis pour la formation de l'ARNr 18S (Figure 16). En 2002, l'équipe de Susan Baserga a réalisé la purification de complexes à partir des protéines Nop58 et Mpp10 connues pour être associées à U3. Cette analyse a mis en évidence 17 autres

protéines appelées Utp (U three protein), qui s'associeraient à U3 (Dragon et al. 2002). Ces protéines se localisent dans le nucléole et sont également importantes pour la formation de l'ARNr 18S (Granneman et Baserga 2005). La même équipe a montré dans une autre étude que la déplétion d'une catégorie d'Utps (t-Utps, pour Utps requis pour la transcription (t)) réduit la transcription de l'ARNr 35S, suggérant une forte dépendance entre la transcription et la maturation de l'ARNr 35S (Gallagher et al. 2004).

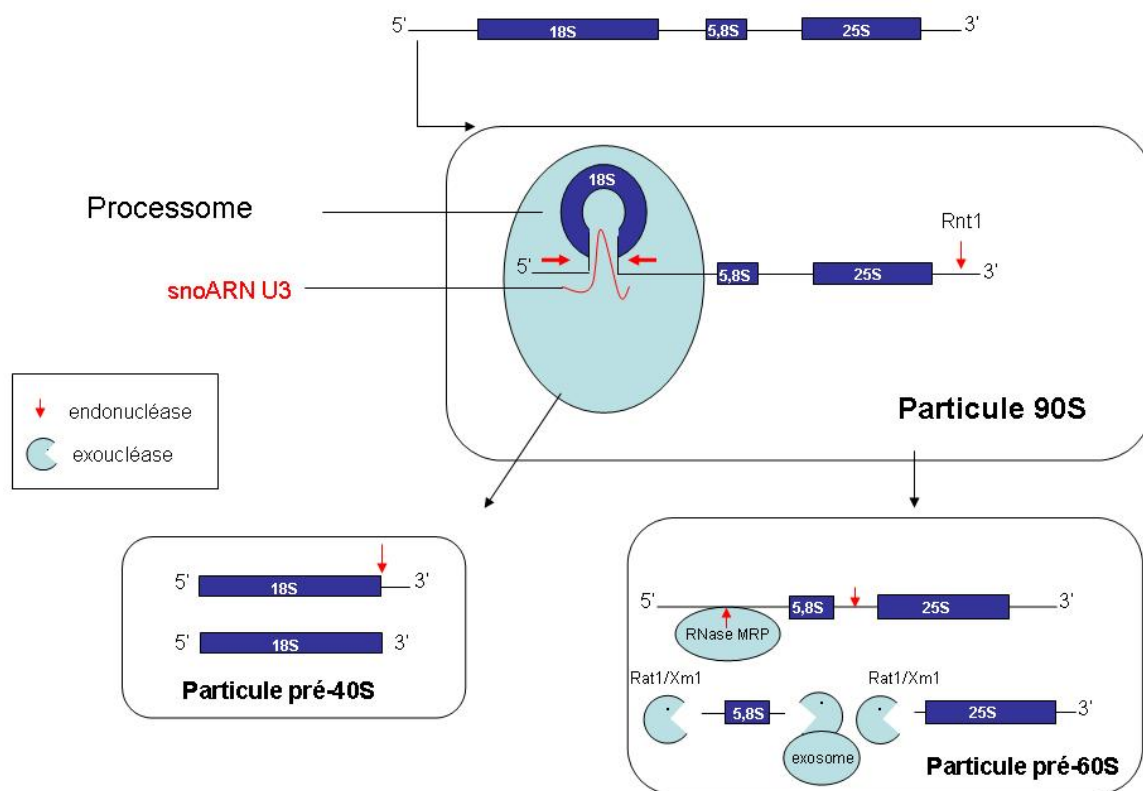


Figure 16 : Représentation des principales formes de pré-ribosomes (90S, 60S et 40S) et quelques-uns des principaux acteurs du clivage (Complexe Utp associé à l'ARN U3 ou processome, exosome, RNase MRP). D'après (Lafontaine and Tollervy 2001).

2. Organisation de L'ADNr chez la levure et chez les mammifères

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la synthèse des quatre ARNr d'eucaryotes est obtenue par la maturation de deux transcrits primaires, les pré-ARNr, synthétisés respectivement par les ARN polymérase I (ARNr 25S, 28S et 5,8S) et III (ARNr 5S) (Figure 15). Leur taille (exprimée en Svedbergs) n'est pas la même chez tous les eucaryotes, d'où une

certain confusion dans la nomenclature puisqu'on parle ainsi de pré-ARNr 35S chez la levure et pré-ARNr 47S chez les mammifères. Dans cette thèse, je parlerai d'ADNr pour le locus transcrit par l'ARN polymérase I et d'ADNr 5S pour celui transcrit par l'ARN polymérase III.

L'ADNr a une grande diversité d'organisation chez les eucaryotes mais je me limiterai ici aux ARNr de levure et de mammifères (Figure 17) qui diffèrent par la taille du transcrit et de la région intergénique. Chez *S. cerevisiae*, l'unité de base de l'ADNr a une taille de 9,1 kb (Figure 17) avec un transcrit de 6,7 kb (l'ARNr 35S) et une séquence intergénique de 2,4 kb. Chez les mammifères, l'ADNr est de 43 kb, avec une séquence codante de 13,7 kb et une séquence intergénique de 29,3 kb.

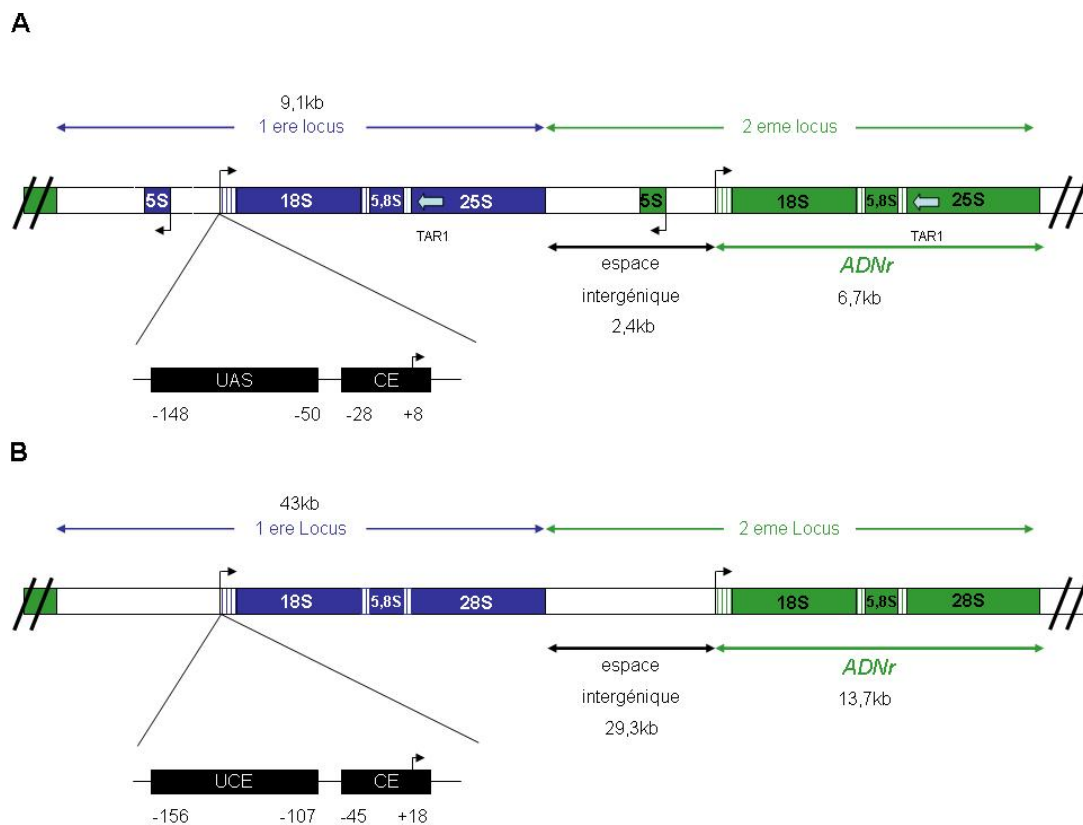


Figure 17 : Structure du locus d'ADNr : Deux unités d'ADNr sont représentées. Les boîtes noires représentent les régions promotrices. Les petites flèches indiquent le site d'initiation de la transcription. UAS = Upstream Activating Sequence, CE = Controle Element, UCE = Upstream Control Element. **(A)** Organisation du locus d'ADNr chez la levure *S. cerevisiae*. Le gène codant pour ARNr 5S est localisé entre deux gènes codant pour ARNr 35S. **(B)** Organisation du locus d'ADNr de cellules humaines. La longueur des séquences est indiquée en kb. La flèche bleu clair dans l'ADNr de *S. cerevisiae* symbolise le gène *TAR1* transcrit par l'ARN polymérase II (Coelho et al. 2002).

Chez les eucaryotes, l'ADNr est typiquement formé d'un grand nombre de copies de la même unité de base. Ces copies sont en général répétées en tandem sur un ou plusieurs loci chromosomiques, les NORs (*Nucleolus Organizer Region*). Chez *S. cerevisiae*, elles sont localisées au sein du même locus, sur le chromosome XII, et sont au nombre de 150 à 200 par génome haploïde. Pour une cellule diploïde humaine, le nombre de ADNr est d'environ 400 copies réparties en 5 loci correspondant aux chromosomes XIII, XIV, XV, XXI et XXII. Une particularité de *S. cerevisiae* est que le gène codant pour l'ARNr 5S se trouve entre deux unités de ADNr, bien que ce soit aussi le cas chez un autre eucaryote, le *Dictyostelium discoideum* (Haeusler and Engelke 2006).

2.1. L'unité de transcription de l'ARN polymérase I

L'étude de délétions au niveau de la région intergénique a montré que la région qui s'étend du nucléotide -146 au nucléotide +8 est suffisante pour la transcription, et cette région a donc été définie comme le promoteur de l'ADNr de *S.cerevisiae* (Musters et al. 1989). Sa mutagenèse a révélé deux domaines distincts, du nucléotide -146 au nucléotide -50 et du nucléotide -28 au nucléotide +8 (Figure 17A). Le domaine en aval est strictement essentiel à l'initiation de la transcription et a été appelé « promoteur basal » ou « Core Element ». Le domaine en amont exerce un effet stimulateur, et a donc été appelé séquence activatrice (Upstream Activating Sequence).

Des expériences similaires chez les mammifères (Learned et al. 1983; Closs and Kempe 1986; Haltiner et al. 1986; Jones et al. 1988) ont montré que l'organisation du promoteur du gène d'ADNr humain ou de souris est également bipartite. Chez l'homme, l'élément amont s'étend du nucléotide -156 au nucléotide -107 tandis que l'élément aval s'entend du nucléotide -45 au nucléotide +18. Le rôle respectif de chacun de ces domaines est également conservé (Figure 17B). L'élément aval est strictement essentiel à la transcription tandis que l'élément amont (appelé chez les mammifères Upstream Control Sequence) permet de stimuler la transcription de l'ADNr. Cependant, il n'y a aucune conservation de séquence de la levure à l'homme sauf une forte proportion de déoxynucléotides A/T de part et d'autre du +1 de la transcription, qui pourrait favoriser l'ouverture de la double hélice.

3. Le cycle de transcription par l'ARN polymérase I

Comme les deux autres ARN polymérases eucaryotiques et comme l'enzyme archéenne, l'ARN polymérase I ne se lie pas directement à l'ADN du promoteur mais reconnaît un complexe de pré-initiation (**PIC**) contenant la TBP (TATA Binding Protein) ou, chez les archées, son homologue TFA (Tableau 4). Dans le cas des ARN polymérase II et III et de l'enzyme archéenne, la parenté du complexe de pré-initiation se manifeste par l'homologie des facteurs TFIIB, Brf1 et TFB ainsi que par celle de TFIIE (ARN polymérase II) et TFE (Archéobactérie) (Colbert and Hahn 1992; Qureshi et al. 1995; Bell et al. 2001). Par ailleurs, deux facteurs d'élongation eucaryotiques (TFIIS et Spt4) correspondent aux sous-unités M et E'' des archées (Hausner et al. 2000; Ponting 2002). Il est donc probable que les trois systèmes de transcription eucaryotiques dérivent d'un prototype archéen qui se serait diversifié en trois systèmes spécialisés I, II, et III.

Tableau 4 : Parenté des complexes d'initiation des systèmes de transcription non-bactérien (eucaryote, archée). E'' : RpoE'', M : RpoM.

Archées	ARN polymérase I	ARN polymérase II	ARN polymérase III
TFA	TBP	TBP	TBP
TFB		TFIIB	Brf1
TFE		TFIIE	
E''	Spt4 (?)	Spt4	
M	Rpa12	Rpb9/TFIIS	Rpc11

Chez la levure, le **recrutement** de l'ARN polymérase I met en jeu deux facteurs de pré-initiation spécifiques (Le Core Factor, et Upstream Activating Factor (UAF)) qui reconnaissent la région promotrice, conduisant ainsi à la formation du **complexe de pré-initiation** (Figure 18). A ce stade le complexe est dit « **fermé** » car il n'y pas encore d'ouverture de la double hélice. Ce complexe est reconnu par l'ARN polymérase I, elle-même associée à un facteur d'initiation spécialisé, la protéine Rrn3, spécifique de l'ARN polymérase I. Selon un schéma hypothétique, inspiré par les systèmes mieux étudiés que sont l'ARN polymérase II et III ou l'enzyme bactérienne, la transcription démarre ensuite par l'ouverture de la double hélice d'ADN de part et d'autre du site de démarrage de la transcription

(complexe **d'initiation ouvert**). L'ARN polymérase serait dès lors capable de catalyser la formation des premiers nucléotides mais sans qu'il y ait déplacement du complexe (**translocation**) le long de l'ADN: c'est seulement lorsque la taille de l'ARN synthétisé atteint une dizaine de nucléotides que l'enzyme quitterait la région promotrice (**promoteur escape**) pour se déplacer le long de l'ADNr (**translocation**). Ces trois étapes (ouverture de la bulle de transcription, promoteur escape, et translocation) passent certainement par des changements de conformation de l'ARN polymérase I. Nous verrons par la suite qu'ils impliquent également le largage de Rrn3. L'étape finale (**terminaison**) conduit à la dissociation du complexe ternaire ADN-ARN polymérase I-ARNr.

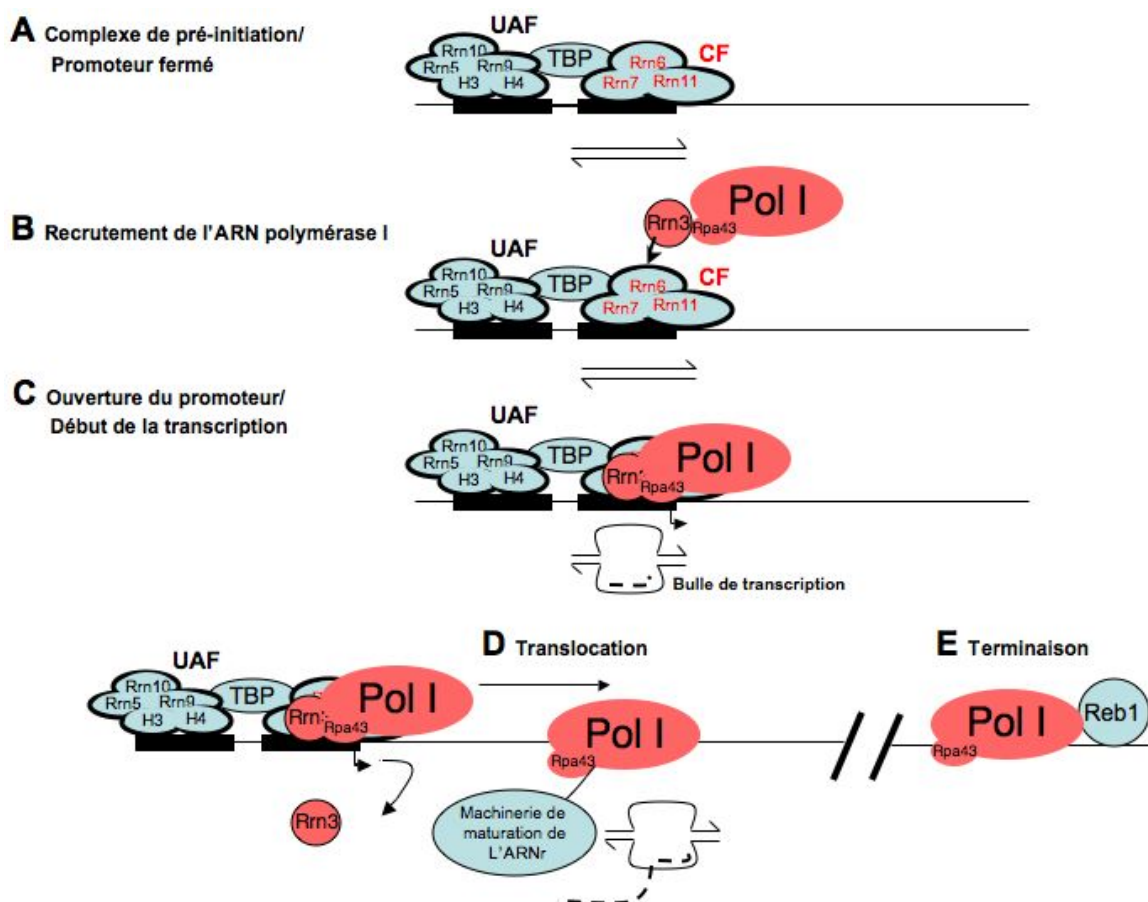


Figure 18 : Les premières étapes de la transcription par l'ARN polymérase I. (A) Formation du complexe de pré-initiation formé par le Core Factor (CF) et l'UAF (Upstream Activating Factor). (B) Recrutement sur le complexe de pré-initiation de l'ARN polymérase I associée à la protéine Rrn3. (C) Ouverture de la double hélice de part et d'autre du site de démarrage de la transcription (complexe d'initiation ouvert). Début de la synthèse de l'ARNr (D) Translocation avec association du processosome à l'ARNr naissant (C) Terminaison : Translocation bloquée par Reb1. D'après Nomura 1998 et Peyroche et al. 2001.

3.1. Le complexe de pré-initiation chez *S. cerevisiae* : Core Factor et UAF

Grâce au crible génétique des mutants *rrn* décrit dans la première partie de l'introduction (voir première partie), l'équipe de Masayasu Nomura a mis en évidence chez *S. cerevisiae* deux facteurs de pré-initiation requis pour le recrutement de l'ARN polymérase I, le Core Factor et l'UAF (associé à la TBP). Le Core Factor reconnaît le promoteur basal, l'UAF, quant à lui, reconnaît la séquence activatrice de la région promotrice.

Le Core Factor (Figure 18) est formé des sous-unités Rrn6, Rrn7 et Rrn11 essentielles à la viabilité cellulaire (Keys et al. 1994; Lalo et al. 1996). L'importance de ce facteur dans la transcription par l'ARN polymérase I est confirmée par le fait que des extraits cellulaires préparés à partir de souches *rrn6Δ*, *rrn7Δ* ou *rrn11Δ* sont incapables d'initier la synthèse de l'ARNr 35S (Keys et al. 1994; Lalo et al. 1996). Par ailleurs, *in vitro*, l'addition de ce complexe reconstitue l'activité transcriptionnelle de fractions préparées à partir de souches *rrn6Δ*, *rrn7Δ* ou *rrn11Δ* et permet la transcription à partir d'un promoteur dépourvu de UAS (Lin et al. 1996; Keener et al. 1998) ce qui suggère que le Core Factor se fixe au promoteur basal.

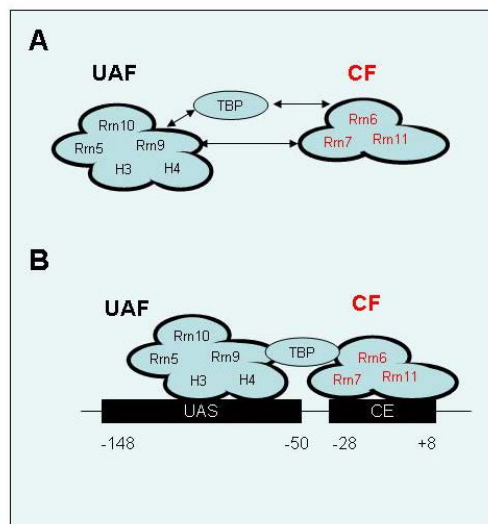


Figure 19 : Complexe de pré-initiation chez *S. cerevisiae*. (A) Facteurs impliqués dans la reconnaissance du promoteur de l'ADNr chez *S. cerevisiae*. UAF (Upstream activating Factor), CF (Core Factor), H3, H4 (Histone H3 et H4). Les flèches indiquent les interactions physiques qui ont été mises en évidence. (B) Modèle d'assemblage du complexe de pré-initiation sur la région promotrice. UAS (Upstream Activating Sequence), CE (Core Element) (Nomura 1998).

L'UAF est composé de Rrn5, Rrn9, Rrn10, d'un polypeptide nommé p30 (UAF30) et, plus curieusement, des histones H3 et H4 (Keys et al. 1996; Keener et al. 1997; Siddiqi et al. 2001b). Rrn5, Rrn9 et Rrn10 sont assez faiblement conservés même parmi les ascomycètes et il n'y a pas d'indication qu'il y ait un facteur homologue chez les animaux. Les gènes codant pour Rrn5, Rrn9, Rrn10 ne sont pas strictement essentiels à la viabilité cellulaire, néanmoins leur délétion confère un très fort retard de croissance aux cellules (Keys et al. 1996) et une

forte réduction de la synthèse de ARNr 35S (Keys et al. 1996). *In vitro*, l'initiation de la transcription est fortement réduite dans des extraits cellulaires dépourvus de Rrn5, Rrn9 ou Rrn10, et restaurée par addition du complexe UAF. Cet effet stimulateur ne s'exerce que si la région promotrice contient la séquence activatrice (UAS) (Keys et al. 1996). Ce facteur s'associe de manière stable à la séquence activatrice du promoteur ce qui stabiliserait la liaison du Core Factor au promoteur basal. Une interaction entre Rrn9 (sous unité de l'UAF) et Rrn7 (sous-unité du Core Factor) semble confirmer cette hypothèse (Steffan et al. 1998) (Figure19).

L'effet stimulateur de l'UAF est fortement dépendant de la présence de la TBP (Figure 18), bien que cette protéine n'ait pas été co-purifiée avec l'UAF (Steffan et al. 1996; Steffan et al. 1998). Cependant, en utilisant un autre protocole de purification, l'équipe de H. Tschochner a observé la co-purification sur plusieurs colonnes chromatographiques de TBP et Rrn9 (Milkereit et al. 1997). Par ailleurs, une interaction double hybride existe entre TBP et la sous unité Rrn9 de l'UAF (Steffan et al. 1998). De ce fait, on peut proposer que la TBP soit la charnière entre le Core Factor (*via* Rrn6) et l'UAF (*via* Rrn9) dans le complexe de pré-initiation (Figure 19).

Le fait que UAF ne soit pas strictement nécessaire à la croissance s'explique probablement par une faible transcription de l'ADNr par une autre polymérase en absence de ce facteur (Oakes et al. 1999; Vu et al. 1999; Siddiqi et al. 2001a; Siddiqi et al. 2001b). Dans un mutant *rrn9Δ*, Rpa135 n'est plus essentiel à la viabilité cellulaire. Cela implique certainement l'intervention de l'ARN polymérase II, car une mutation thermosensible de la sous-unité Rpb1 (*rpb1-1*), empêche totalement la synthèse de l'ARNr dans une souche *rrn9Δ*. UAF serait donc est non seulement un activateur de la transcription de l'ARNr par l'ARN polymérase I, mais également un répresseur d'une faible transcription résiduelle par l'ARN polymérase II. Par ailleurs, il existe probablement un gène transcrit par l'ARN polymérase II au sein de l'ARNr de levure (Coelho et al. 2002).

3.2. Recrutement de l'ARN polymérase I sur le Complexe de pré-initiation :

Rrn3/TIF-IA

La protéine Rrn3 a d'abord été identifiée génétiquement à partir des mutants *rrn* obtenus par Nogi *et al.* (Nogi et al. 1991a). *In vivo* et *in vitro* l'ARN polymérase I n'est capable d'être recrutée au promoteur et d'engager un cycle transcription que si elle est associée à Rrn3 (Yamamoto et al. 1996; Milkereit and Tschochner 1998). Peyroche *et al.*

(Peyroche et al. 2000) ont ensuite montré que Rrn3 s'associe à l'ARN polymérase I *via* la sous-unité Rpa43. Sur la base d'une interaction double-hybride, ces auteurs ont également proposé que le recrutement du complexe Rrn3/ARN polymérase I sur le complexe pré-initiation se fasse par une interaction entre Rrn3 et Rrn6 (Figure 18). Enfin, une souche dépourvue des gènes *RRN3* et *RPA43* est complétée par une fusion Rrn3::Rpa43 ce qui montre que la seule fonction essentielle de Rrn3 est de se lier à Rpa43 (Laferte et al. 2006).

Chez les mammifères, le recrutement de l'ARN polymérase I fait intervenir un facteur TIF-IA qui est l'équivalent structurel et fonctionnel de Rrn3 (Figure 20) (Buttgereit et al. 1985; Schnapp et al. 1990b; Bodem et al. 2000; Moorefield et al. 2000; Miller et al. 2001). La létalité due à la délétion du gène *RRN3* est partiellement supprimée par TIF-IA (Moorefield et al. 2000). Le facteur TIF-IA est également essentiel pour former une interaction entre l'ARN polymérase I et le complexe SL1/TIF-IB, dont nous verrons plus loin qu'il est l'homologue fonctionnel du Core Factor de levure. TIF-IA/hRrn3, s'associe à la polymérase I *via* une interaction avec l'homologue de la sous-unité Rpa43 de levure (Cavanaugh et al. 2002; Yuan et al. 2002) et permet le recrutement de l'enzyme sur les séquences promotrices de l'ADNr grâce à des interactions avec les sous-unités TAF₁₆₃ (Rrn7) et TAF₁₁₀ du complexe SL1/TIF-IB (Miller et al. 2001; Yuan et al. 2002). On notera cependant que chez la levure la cible de Rrn3 sur le Core Factor est Rrn6.

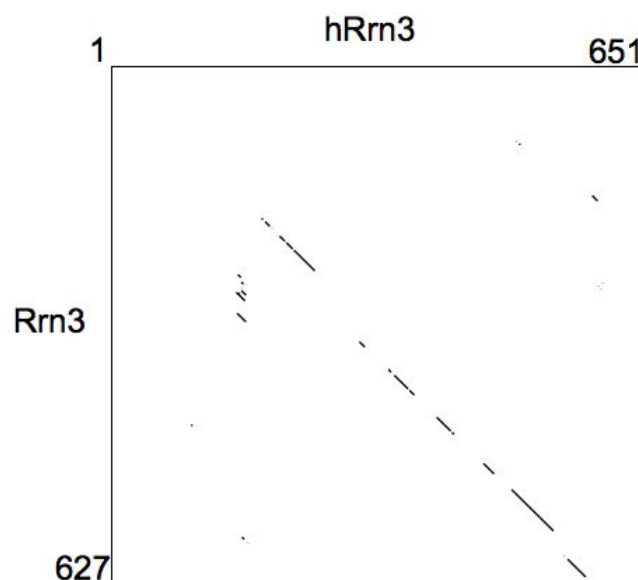


Figure 20 : Alignement de la séquence primaire en acides aminés entre Rrn3 de *S. cerevisiae* et le facteur humain hRrn3.

3.3. Le complexe de pré-initiation de l'ARN polymérase I chez les mammifères

L'étude biochimique du complexe de pré-initiation de la transcription de l'ARN polymérase I a été réalisée chez la souris et chez l'humain. Cette étude a identifié deux facteurs, UBF (Upstream Binding Factor), et TIF-IB (souris) ou SL1 (humain). Nous avons vu plus haut qu'il existe une certaine conservation de l'organisation du promoteur de l'ADNr entre la levure et les mammifères ce qui laissait supposer une homologie fonctionnelle entre leurs facteurs de pré-initiation. Toutefois, le clonage et la caractérisation de ces facteurs ont montré peu d'homologie de séquence, en dehors de TIF-IA, qui est l'homologue très conservé de Rm3.

Le Facteur SL1/TIF-IB

Chez la souris TIF-IB est strictement essentiel à l'initiation de la transcription basale *in vitro* (Clos et al. 1986; Schnapp et al. 1990a). TIF-IB est responsable de la reconnaissance du promoteur basal. L'homologue humain de TIF-IB, le facteur SL1 a été identifié par l'équipe de Tjian (Learned et al. 1985) en tant que facteur de sélectivité, permettant de rétablir l'initiation de la transcription sur les promoteurs humains en présence de facteur de transcription de souris (Learned et al. 1985).

SL1/TIF-IB (Tableau 5) est un complexe de 300 kDa, composé de la TBP et de trois sous-unités distinctes appelées hTAF_I110, hTAF_I63 et hTAF_I48 chez l'humain et mTAF_I95, mTAF_I68 et mTAF_I48 chez la souris (Comai et al. 1992; Comai et al. 1994; Zomerdijs et al. 1994; Heix et al. 1997). Ces protéines sont fortement conservées entre l'homme et la souris. Cependant SL1 et TIF-IB ne sont pas interchangeables *in vitro*.

La terminologie 'TAF_I' pour « TBP associated factor of class I » renvoie à la purification par affinité de facteurs protéiques liés à TBP, et divisés en trois grands types selon qu'ils participent à la transcription catalysée par la Pol I, II ou III (Hernandez 1993). Des anticorps dirigés contre TBP inhibent la transcription spécifique *in vitro* en immunodéplétant SL1/TIF-IB, démontrant que la TBP est importante pour la transcription basale de l'ARN polymérase I dans les cellules humaines.

Souris (TIFI-B)	Humain (SL1)
TBP	TBP
mTAF _I 68	hTAF _I 63
mTAF _I 48	hTAF _I 48
mTAF _I 95	hTAF _I 110
mTAF _I 41	hTAF _I 41

Tableau 5 : Composition de TIF-IB (souris) et SLI (humain). mTAF_I68 est l'homologue de hTAF_I63, mTAF_I48 est l'homologue de hTAF_I48, et mTAF_I95 est l'homologue de hTAF_I110. La TBP est présente dans les deux complexes (Zomerdijsk et al. 1994; Heix et al. 1997).

Un système *in vitro* constitué des formes recombinantes des quatre protéines du complexe SL1 était insuffisant pour induire la transcription (Heix et al. 1997). Cela suggère que d'autres facteurs et/ou des modifications supplémentaires sont requis pour une activité optimale de SL1. En effet, à partir de cellules humaines, une quatrième TAF_I de 41 kDa (TAF_I41) a été isolée par l'équipe de Zomerdijsk (Gorski et al. 2007).

In vivo, la déplétion de TAF_I41 s'accompagne d'un défaut de recrutement de l'ARN polymérase I et d'une diminution de la transcription par l'ARN polymérase I. TAF_I41 serait important pour le recrutement de l'ARN polymérase I peut-être *via* une interaction avec le facteur d'initiation TIF-IA essentiel pour le recrutement de l'ARN polymérase I (cette protéine est décrite ci-dessous).

UBF

UBF a été purifié à partir de cellules humaines sur la base de son affinité pour la séquence activatrice (UCE) et de son aptitude à stimuler la transcription basale *in vitro* (Bell et al. 1988; Pikaard et al. 1989; Bell et al. 1990). Il existe deux formes d'isoformes (UBF1 et UBF2) chez les mammifères résultant d'un épissage différentiel (Hisatake et al. 1991; Kuhn et al. 1994). Néanmoins, seul le facteur UBF1 est capable de stimuler cette activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I (Kuhn et al. 1994).

La structure de UBF1 contient six domaines HMG consécutifs (pour High Mobility Group) responsables de sa liaison à l'ADN ainsi qu'une extrémité C-terminale acide (Jantzen et al. 1990; Leblanc et al. 1993). Ces domaines HMG sont des séquences d'environ 80 aa riches en acides aminés aromatiques et acides (Figure 21) qui ont été initialement observées

chez les protéines HMG1 et HMG2 associées à la chromatine dans les mammifères (Weir et al. 1993). Les motifs HMG se lient à l'ADN sans spécificité de séquences.

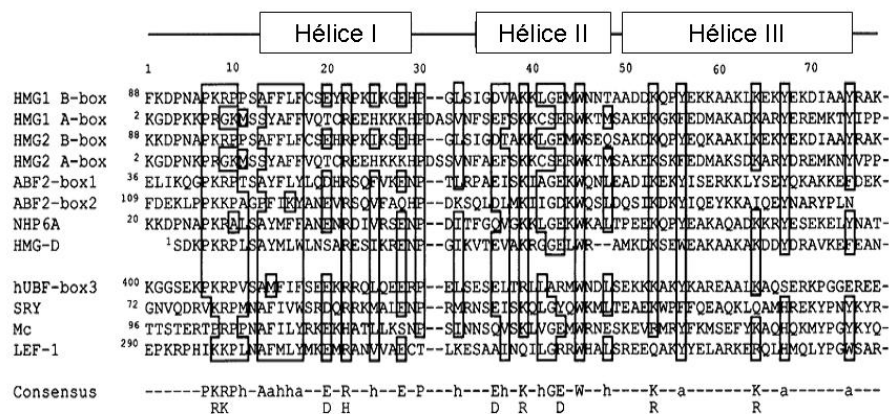


Figure 21 : Alignement de séquences sur le motif HMG de différentes protéines. La séquence consensus montre que les motifs HMG sont riches en acides aminés aromatiques et hydrophobes. (a) représente les acides aminés aromatiques : Y, F, W et H (h) les acides aminés hydrophobes : V, I, A, L et F. Abréviations : HMG1 et HMG2, high mobility group proteins 1/2 (Bianchi et al. 1989; Shirakawa et al. 1990); ABF2, ARS binding factor de *S. cerevisiae* (Diffley and Stillman 1991); NHP6A, non-histone protein A de *S. cerevisiae* (Kolodrubetz and Burgum 1990); HMG-D, high mobility group protein D de *Drosophila melanogaster* (Wagner et al. 1992); hUBF, upstream binding factor humain (Jantzen et al. 1992); SRY, Facteur de détermination du testicule humain (Sinclair et al. 1990); Mc, protéine de « mating » de *Schizosaccharomyces pombe* (Kelly et al. 1988); LEF-1, lymphoid enhancer factor 1 de souris (Travis et al. 1991). Tirée de (Weir et al. 1993).

In vitro, UBF agit en tant que dimère en se fixant à la fois sur la séquence activatrice et le promoteur basal (Figure 22). Cette dimérisation, essentielle à son activité stimulatrice, se ferait par la région N-terminale (McStay et al. 1991; Jantzen et al. 1992). La fixation de UBF à l'ADN induit une boucle sur 140pb de l'ADN, générant ainsi une structure appelée « enhancesome » (Bazett-Jones et al. 1994), ce qui juxtaposerait la séquence activatrice et le promoteur basal (Bazett-Jones et al. 1994) et (Stefanovsky et al. 2001).

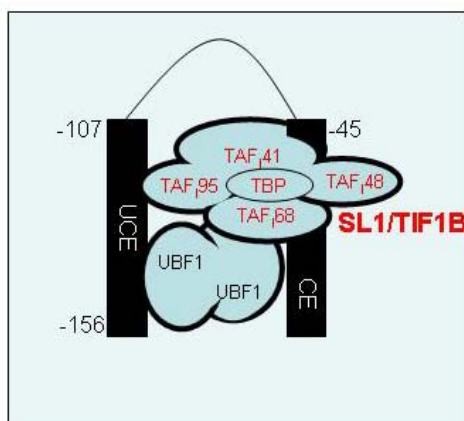


Figure 22 : Modèle d'assemblage du complexe de pré-initiation sur le promoteur du ADNr. En contactant simultanément l'élément amont et la partie proximale de l'élément basal, UBF induirait une courbure de l'ADN au niveau du promoteur de l'ADNr.

Le fait que UBF ait été isolé comme un facteur se liant **spécifiquement** à l'UCE a suggéré que UBF serait uniquement un facteur d'initiation qui co-opérait avec SL1 pour organiser un complexe pré-initiation pour le recrutement de l'ARN polymérase I (Learned et al. 1986; Bell et al. 1988). Cependant, l'équipe de Zomerdijk, en utilisant un système de transcription purifié, a montré que UBF agirait également après le recrutement, en activant la transcription au niveau du « promoteur escape » (Panov et al. 2006a). D'autres données montrent que UBF n'est pas restreint à la région promotrice mais est également présent sur l'ensemble du ADNr, renforçant l'idée que UBF serait bien plus qu'un facteur du complexe de pré-initiation (O'Sullivan et al. 2002). Enfin, UBF aurait un effet négatif sur l'élongation en agissant sur la chromatine (Stefanovsky et al. 2006). Cette inhibition est levée suite à la phosphorylation par la voie ERK1/2 Map kinase de deux des boîtes HMG de UBF (Stefanovsky et al. 2006). Il est donc possible que UBF, en tant que protéine à HMG, organise l'ensemble du ADNr de façon à optimiser le complexe de transcription lors de toutes les étapes de la transcription, mais on est loin de comprendre sur quoi repose cette « optimisation ».

Quels sont les homologues d'UBF et de SL1/TIF-IB chez *Saccharomyces cerevisiae* ?

SL1/TIF-IB est probablement l'équivalent fonctionnel du Core Factor (Tableau 6). En effet, ces deux complexes se lient tous deux au promoteur basal afin de permettre une transcription basale de l'ADNr (Schnapp and Grummt 1991; Lin et al. 1996; Keener et al. 1998). Au sein du complexe de préinitiation, ces complexes sont donc tous deux responsables du recrutement de l'ARN polymérase (Peyroche et al. 2000; Miller et al. 2001; Friedrich et al. 2005). Cependant, l'homologie de séquence entre les sous-unités du Core Factor et les sous-unités de SL1/TIF-IB sont restreintes à Rrn7 et TAF₁₆₈ où elle est d'ailleurs plutôt faible (Boukhgalter et al. 2002) (Figure 23). Il est tentant de supposer que les deux autres sous-unités Rrn6 et Rrn11 sont plus ou moins équivalentes aux deux autres TAFs de SL1, mais cela ne se traduit pas par une conservation de séquence détectable.

Tableau 6 : Parenté entre le système de transcription de levure et celui des mammifères.
Inspiré de (Grummt 2003).

Levure	Rrn3	Core Factor	TBP	Hmo1	TFIIH	Rad26	Reb1
Mammifère	TIF-IA/hRrn3	SL1/TIF-IB	TBP	UBF	TFIIH	CSB	TTF-I

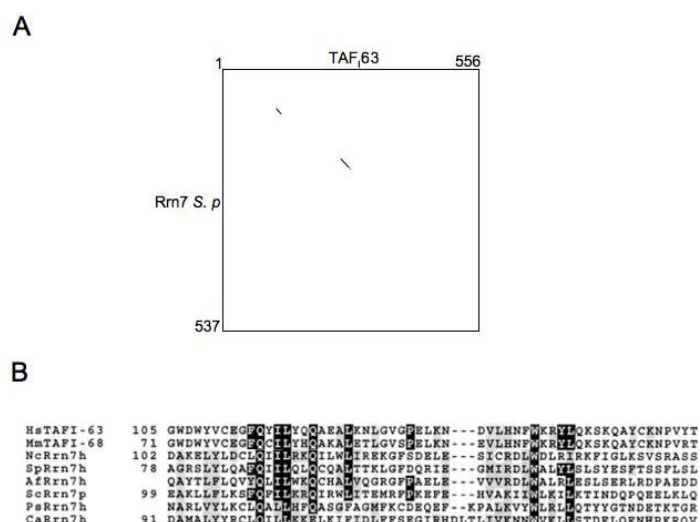



Figure 23 : Alignement de séquence montrant une homologie entre Rrn7 de levure et TAF₆₃ d'humain ou TAF₆₈ de levure. (A) La matrice montre qu'il y a très peu d'homologie entre Rrn7 de *S. pombe* et TAF₆₃ d'humain (B) Les résidus identiques sont indiqués en noir et les résidus conservés sont indiqués en gris (Boukhgalter et al. 2002).


L'homologue d'UBF chez *S. cerevisiae* est probablement Hmo1 (Gadal et al. 2002). Hmo1 est une protéine possédant un motif HMG (Lu et al. 1996) présente sur l'ensemble de l'ADNr dont la surexpression corrige les défauts transcriptionnels associés à l'inactivation la sous-unité Rpa49 de l'ARN polymérase I (Tableau 6, Figure 24) (Gadal et al. 2002). Elle se termine également par une région fortement hydrophile (acide dans le cas d'Hmo1). Comme pour UBF le rôle d'Hmo1 dans la transcription par l'ARN polymérase I reste mal connu, mais le fait qu'elle soit associée à l'ensemble de la région transcrite suggère qu'elle participe à l'étape d'élongation de la transcription par l'ARN polymérase I (Hall et al. 2006). Par ailleurs, Hmo1 est également présente sur les gènes des protéines ribosomales et sur le régulon (transcrit par l'ARN polymérase II) auquel ils appartiennent (Hall et al. 2006; Kasahara et al. 2007, Berger et al. 2007). Cela suggère fortement que Hmo1 joue un rôle important dans la coordination transcriptionnelle de l'ARN polymérase I (ADNr) et de l'ARN polymérase II (gènes des protéines ribosomales).

rpa49-Δ (25°C)



- + 2μ chasse
HMO1 HMO1

B



Hmo1 106 PKKPLTVFFAYSAYVROQLREDRQKAGLPPLSSTEITQEISKKWKLSDNKEKWKQAYNVELENYQR 173
hUBF 112 PKKPLTPYFRFFMEKRAKYAKLH-----PEMSNLDLTKILSKKYKELPEKKMKMYIQDFQREKQEFER 174
hUBF 199 ETKPPQQLWYTHEKKVYLKVR-----PDAATTEKYKDSLCKQWSQLSDKKRLKWIHKALEQRKYEYEE 258
hUBF 297 ETKPPPNSSYSLYCAELMANMKDV-----PSTERMVLCSQQ-----WKLISQKEKDAYHKKCDQKKKDYEV 356
hUBF 407 PKRPVSAMFIFSEKKRQLQEER-----PELSESELTRLLARMNDLSEKKKAKYKAREAAKQASER 466

3.4. Elongation

L'élongation du transcrit requiert très probablement un ou plusieurs changements de conformations de l'ARN polymérase, pour rompre l'interaction avec le complexe d'initiation, et permettre la translocation (Figure 18). Il est en outre probable qu'au cours de l'élongation les ARN polymérases ne se déplacent pas à vitesse constante, en fonction de contraintes physiques (chromatine, topologie de l'ADN) pouvant moduler ou arrêter transitoirement leur progression. Chez les eucaryotes, la majorité des études sur l'élongation de la transcription ont été menées sur l'ARN polymérase II (Conaway et al. 2000) et ont fait apparaître l'existence d'un ensemble de facteurs spécialisés dits d'élongation. Les principaux de ces facteurs sont indiqués dans le Tableau 7. En plus de ces facteurs d'élongation spécialisés, il est maintenant établi que l'étape d'élongation par l'ARN polymérase II est fortement liée au devenir ultérieur du transcrit (c'est dire à l'ajout en 5' d'une coiffe par « capping »), et à l'export de celui-ci vers le cytoplasme par le complexe THO/TREX (Jimeno et al. 2002; Ahn et al. 2004; Hurt et al. 2004; Schroeder et al. 2004; Zorio and Bentley 2004). Le domaine C-

terminal (CTD) de l'ARN polymérase II a une place centrale dans ce couplage entre la transcription et la mise en place de la coiffe de l'ARNm. En effet, le recrutement des enzymes de la coiffe se fait au niveau du CTD de l'ARN polymérase II, lorsque celui-ci est phosphorylé au niveau de sa sérine 5 par la kinase Kin28 de TFIIF (Cho et al. 1998; Komarnitsky et al. 2000; Rodriguez et al. 2000; Schroeder et al. 2000; Bentley 2002).

Quels sont les facteurs d'élongation de l'ARN polymérase I ?

Les mécanismes contrôlant l'élongation par l'ARN polymérase I sont encore mal connus. Des résultats récents, encore que spéculatifs, suggèrent que certaines des protéines intervenant dans l'élongation par l'ARN polymérase II opèrent également avec l'ARN polymérase I. Il s'agit spécifiquement des facteurs Spt4, Spt5, Spt6, TFIIF et CSB/Rad26 (Swanson et al. 1991; Bortvin and Winston 1996; Selby and Sancar 1997; Rondon et al. 2003). De plus, il y a une forte interdépendance entre l'élongation par l'ARN polymérase I et la maturation du pré-ARNr 35S (Gallagher et al. 2004; Schneider et al. 2007), ce qui évoque l'interdépendance qui existe entre l'élongation par l'ARN polymérase II et les étapes de la mise en place de la coiffe en 5' des ARNm et l'export (TRO/TREX) de ces derniers.

Facteurs d'élongation par l'ARN polymérase II		
Facteur	Activité	Commentaire
Spt4/Spt5 (DSIF)	Inhibe l'élongation	Stimule l'élongation dans certaines conditions
FACT/Spt16	Stimule la transcription sur matrice chromatinienne	
Spt6	Stimule la transcription sur matrice chromatinienne	
Rad26 (CSB)	Supprime le nombre de pauses de l'ARN polymérase II	Le gène CSB muté conduit au syndrome de Cockayne
TFIIS	Stimule l'activité de clivage de l'ARN polymérase II	
TFIIF	Supprime le nombre de pauses de l'ARN polymérase II	Intervient dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides
TFIIH	Nécessaire pour le passage en translocation	

Tableau 7 : Présentation de quelques facteurs d'élongation par l'ARN polymérase II. Inspiré de la revue (Conaway et al. 2000).

Spt5-Spt4

La première indication que Spt4 et Spt5 pourraient intervenir dans la transcription par l'ARN polymérase I (Hartzog et al. 1998; Lindstrom et al. 2003) (Tableau 7) vient d'une étude qui a montré que plusieurs sous-unités de l'ARN polymérase I co-purifient avec Spt5 (et donc probablement avec l'ensemble de l'ARN polymérase I). L'équipe de Nomura a également montré, en utilisant la technique d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP), que Spt4 et Spt5 s'associent au ADNr (Schneider et al. 2006). Enfin, dans notre service, Gérald Peyroche (Thèse 2000) a montré que les protéines Spt5 et Spt6 (facteur de remodelage de la chromatine) interagissent en double-hybride avec Rpa43.

Nous avons donc décidé d'investiguer le rôle des protéines Spt5 et Spt6 dans la transcription par l'ARN polymérase I. Les domaines de Rpa43 nécessaires à l'interaction avec Spt6 et Spt5 ont été définis (Partie expérimentale). J'ai également observé que l'allèle *spt16-14* aggrave le phénotype de croissance d'un mutant de Rpa43 (*rpa43-chim2*). Cependant, contrairement à Schneider *et al.* (2006) je n'ai pas observé la présence de Spt5 et celle de Spt6 sur l'ADNr en utilisant la technique d'immuno-précipitation de la chromatine (Figure 26). Lors de mes expériences de ChIP, j'ai comparé l'enrichissement de ces facteurs de transcription sur la région codante du ADNr par rapport à leur enrichissement sur la région NTS (supposée être dépourvue de transcription). Or, ce contrôle n'a pas été fait par Schneider *et al.* (2006) et leur résultat ne permet pas, selon moi, d'affirmer que les protéines Spt4 et Spt5 sont sur l'ADNr.

Schneider *et al.* (2006) ont montré également que l'inactivation du facteur Spt4 provoque un défaut de maturation du pré-ARNr et un défaut d'assemblage des ribosomes, suggérant ainsi que ce facteur serait important dans le couplage entre la transcription et la maturation du pré-ARNr 35S (Schneider et al. 2006). Néanmoins, ces effets pourraient s'expliquer par un défaut de transcription de gènes de protéines impliquées dans la maturation du pré-ARNr 35S, dû à l'absence de Spt4. En conclusion, le fait que Spt5 et Spt4 co-purifient avec plusieurs sous-unités de l'ARN polymérase I et que Spt5 interagit en double hybride avec Rpa43 suggère l'implication de ces protéines dans la transcription de l'ARNr, mais celle-ci n'a pas été clairement démontrée.

TFIIH

TFIIH est un facteur hétéromultimérique de très grande taille (510 kDa). Ce complexe est original car il est impliqué dans la transcription et dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (Nucléotides Excision Repair, NER), qui prend en charge la réparation des lésions dues aux ultraviolets (UV), comme les groupes de J. Hoeijmakers et de J-M. Egly l'ont montré (Egly 2001). Il a ainsi été montré qu'une double activité ADN hélicase ($5' \rightarrow 3'$ et $3' \rightarrow 5'$) était associée à deux sous-unités de TFIIH (XPD pour la première et XPB pour la seconde) dont les mutations sont à l'origine chez l'homme du *Xeroderma pigmentosum*. Cette maladie se traduit par une grande sensibilité aux UV et par une forte prédisposition aux cancers cutanés et elle est due à une déficience du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides. Les protéines XPD et XPB sont les homologues respectifs de Rad3 et Rad25 chez la levure *S. cerevisiae*.

Le rôle précis de TFIIH dans la transcription reste assez mal connu. Il semble que l'activité hélicase $3' \rightarrow 5'$ exercée par Rad25 assure l'ouverture de la bulle de transcription (Holstege et al. 1996; Holstege et al. 1997). TFIIH contient également une activité kinase assurée par la protéine Kin28 qui n'agit pas dans la réparation mais elle est essentielle à la transcription car elle assure la phosphorylation de la sérine 5 du CTD et donc le passage vers la phase de translocation de l'enzyme (Cismowski et al. 1995; Conaway et al. 2000).

Les équipes de I. Grummt (Iben et al. 2002) et de J-M. Egly ont proposé la participation du facteur TFIIH dans la transcription par l'ARN polymérase I. Cette conclusion se base sur le fait que TFIIH est capable de stimuler *in vitro* la transcription par l'ARN polymérase I. De plus, il a été localisé dans les nucléoles de cellules humaines. Néanmoins, on ne sait pas si la présence de TFIIH n'est pas due à une éventuelle présence d'ARN polymérase II dans le nucléole.

Ces auteurs ont également suggéré un rôle de TFIIH dans la transcription par l'ARN polymérase I de *S. cerevisiae*, en se basant toutefois sur le fait que des mutants de TFIIH (*kin28-ts* et *tbf1-ts*) présentent des défauts de transcription par l'ARN polymérase I. En me fondant sur ces observations, j'ai donc recherché sur l'ADNr la présence de TFIIH par d'immuno-précipitation de chromatine. À l'issue de ces expériences, je n'ai pas détecté TFIIH sur l'ADNr alors qu'il est parfaitement détectable sur des gènes transcrits par l'ARN polymérase II (Figure 25). Ces données ne remettent pas nécessairement en cause les

conclusions tirées pour les mammifères, mais jettent un doute sur la participation de TFIIH dans la transcription par l'ARN polymérase I de levure.

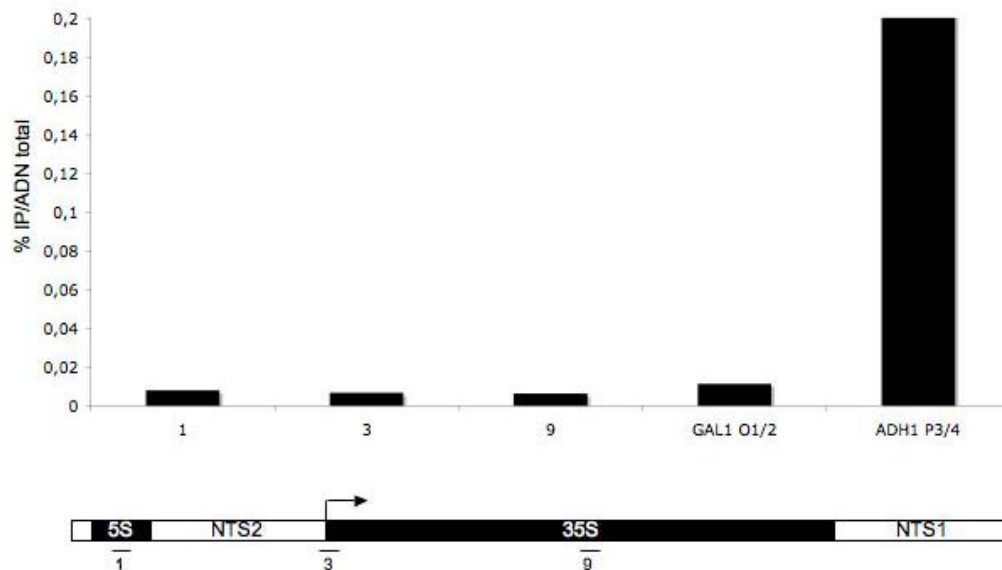


Figure 25 : TFIIH dans la transcription par l'ARN polymérase I? Etude par immuno-précipitation de chromatine de l'occupation de Rad3 sur l'ADNr. L'ADNr n'est pas enrichie en TFIIH. Néanmoins, Rad3 est parfaitement détectable sur le promoteur du gène *ADH1*. Les souches ont été cultivées dans un milieu YPD. Lors de nos expériences de ChIP, nous avons comparé l'enrichissement de Rad3 sur le ADNr par rapport à leur enrichissement sur le gène *GAL1* (supposé être dépourvu de transcription en présence de glucose).

CSB/Rad26

Les mêmes équipes ont également montré que la protéine humaine CSB localise dans le nucléole et stimule *in vitro* la transcription par l'ARN polymérase I (Bradsher et al. 2002). Cette protéine est importante dans la transcription couplée à la réparation (Sarker et al. 2005). Sa mutation conduit au syndrome de Cockayne, où les patients sont atteints d'une hypersensibilité aux UV, d'un fort retard mental et d'une atrophie rétinienne (Lehmann 2003). Ces symptômes pléiotropes ne s'expliqueraient que si CSB était un facteur général de l'ARN polymérase II. En effet, des données *in vitro* montrent également que les extraits acellulaires préparés à partir des échantillons de patients atteints du syndrome de Cockayne portent un défaut transcriptionnel par l'ARN polymérase II, cela en absence de dommage à l'ADN (Balajee et al. 1997; Dianov et al. 1997).

Dans le laboratoire, nous nous sommes intéressés à la protéine Rad26 orthologue de CSB. Comme CSB, la protéine Rad26 est importante pour le couplage de la transcription à la

réparation (Tijsterman et al. 1997). Trois publications suggèrent que Rad26 serait associée de manière constitutive à l'ARN polymérase II lors de l'étape d'élongation. Premièrement un mutant *rad26Δ* a été décrit comme présentant un défaut de croissance dans certaines conditions, notamment une sensibilité au mycophénolate qui évoque un défaut transcriptionnel (Lee et al. 2001). Deuxièmement, il a été montré que *rad26Δ* présente un effet *SPT* (Suppressor of Ty), c'est-à-dire une capacité à supprimer les défauts de croissance dus à l'insertion d'un transposon Ty en amont du gène *HIS4* (Gregory and Sweder 2001). Enfin, une dernière étude a montré que le double mutant *rad2Δ rad26Δ* porte un fort retard de croissance par rapport aux simples mutants *rad2Δ* et *rad26Δ* (Lee et al. 2002). Cependant, nous avons été incapables de reproduire aucune de ces données à partir de mutants *rad26Δ* bien caractérisés par PCR. De plus, nous n'avons pas pu détecter la présence de Rad26 ni sur les gènes transcrits par l'ARN polymérase II ni sur l'ADNr. Ces résultats indiquent que Rad26 ne serait donc pas un facteur qui participe normalement à l'élongation par l'ARN polymérase II (et par l'ARN polymérase I) chez la levure. Par contre il est tout à fait possible que Rad26 soit recruté au niveau des complexes d'élongation à la suite de lésion de l'ADN.

Assemblage co-transcriptionnel de la machinerie de maturation des ARNr

En 1969 Miller et Beatty ont observé chez le Xénope que les pré-ARNr en cours de transcription sont décorés en 5' de boules évoquant un arbre de Noël (Miller and Beatty 1969). La composition et la nature biochimique de ces structures sont restées longtemps inconnues. Cependant, des études chez le Xénope ont montré que les séquences d'ARNr ribosomiques requises pour la maturation des ARNr sont également requises pour la formation des petites boules. Sur cette base, il a été proposé que les boules terminales représentent la machinerie de maturation qui assemble le pré ARN ribosomique en cours de transcription (Mougey et al. 1993a; Mougey et al. 1993b). La levure présente également ces arbres de Noël, et il a été récemment montré (Figure 26) que la déplétion de certaines protéines du processome, requises pour la formation de la sous-unité 40S, bloque la formation des boules (Dragon et al. 2002; Osheim et al. 2004). Ces évidences conduisent à proposer que le processome correspond aux boules en 5' des ARNr en cours de transcription et suggèrent l'existence d'un l'assemblage co-transcriptionnel du processome.

Gallagher et ses collègues ont également proposé qu'un sous-groupe de protéines appartenant au processome participerait à la transcription par l'ARN polymérase I. En effet, la déplétion de ces protéines nommées t-Utps diminue la transcription de l'ARNr 35S (Gallagher et al. 2004). De plus, l'étude de l'occupation de ces protéines par immuno-précipitation de la chromatine montre qu'elles sont associées avec l'ADNr. Ces données suggèrent donc qu'une classe de Utps régule l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I. Néanmoins, l'étape de la transcription qui est favorisée par les t-Utps reste inconnue. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la déplétion des t-Utps sur la formation du complexe de pré-initiation (Core Factor et UAF) ou encore du recrutement de la Polymérase I. L'étape d'élongation de la transcription pourrait être également stimulée par ces protéines. Si c'est le cas on s'attend à ce que des mutations au sein des t-Utps soient sensibles à des inhibiteurs de l'élongation tel le mycophénolate.

Une étude récente réalisée par Schneider *et al.* (2007) a renforcé la notion d'interdépendance entre l'étape d'élongation et celle de la maturation de l'ARNr 35S. Une mutation (*rpa135-D784G*) dans le site actif de l'ARN polymérase I provoque un défaut d'élongation et conduit également à des défauts de maturation du pré-ARNr et d'assemblage des ribosomes. Ces données indiquent donc qu'il y a un recrutement très rapide du processome dans le début de la transcription de l'ARNr 35S. Gallagher *et al.* (2004) proposent que le processome soit recruté par l'ARN polymérase I, mais il se peut que ce recrutement se fasse par l'ARNr 35S naissant (D. Lafontaine et M. Wéry communication personnelle).

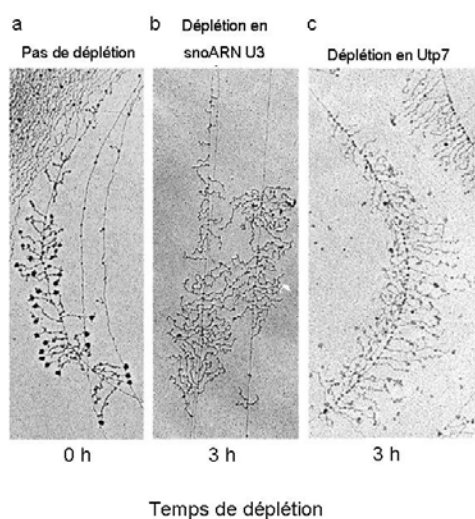


Figure 26: Effets de la déplétion des composants du processome sur la formation des boules. snoARN U3 et l'Utp7 sont requis pour la formation des boules à l'extrémité 5' du pré-ARNr naissant. Les gènes codant pour snoARN U3 et l'Utp7 sont mis sous le contrôle du promoteur *GAL*. La déplétion des souches en snoARN U3 et en Utp7 se fait en présence de glucose. Echelle, la largeur du cliché « a » est de 0,85 µm. D'après Dragon et al. (2002).

3.5. Terminaison de la transcription

Ce processus est déclenché par des séquences spécifiques, les terminateurs. On suppose que les facteurs spécifiques (Reb1 chez la levure et TTF-I chez la souris) se fixent sur les terminateurs et agissent comme des barrières qui bloquent la translocation de l'ARN polymérase I (Jeong et al. 1996). Chez *S. cerevisiae*, le terminateur est une séquence notée T1, située 13 nucléotides après la région transcrite par l'ARN polymérase I (Lang and Reeder 1993; Lang et al. 1994; Reeder et al. 1999) (Figure 27). Chez les mammifères, l'organisation est similaire, le terminateur est composé d'une séquence répétée 8 fois (T1 à T8), qui est située 21 nucléotides en aval de la séquence transcrite (Grummt et al. 1985; Grummt et al. 1986b) (Figure 27).

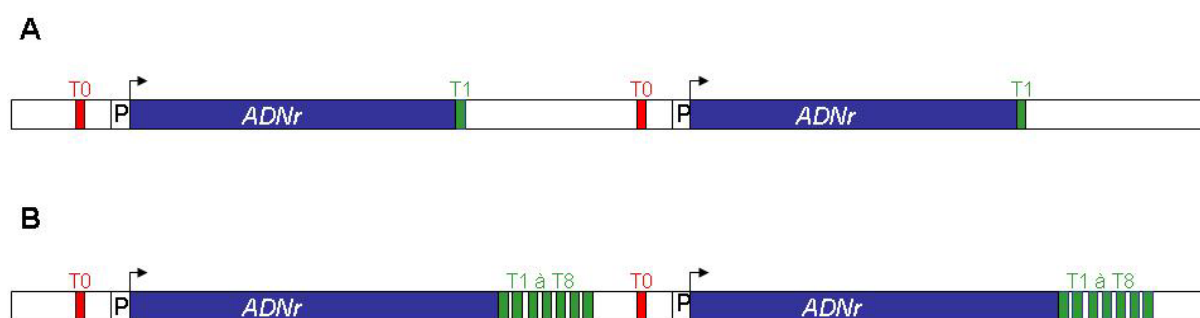


Figure 27 : Localisation des éléments terminateurs au sein de l'unité d'ADNr. (A) Représentation schématique de deux unités successives d'ADN ribosomique de *S. cerevisiae*. La séquence transcrite par l'ARN polymérase I est indiquée par une boîte bleue. Le promoteur est noté par un « P ». L'élément de pause T1 est indiqué en vert, le terminateur proximal T0 est indiqué en rouge. **(B)** Représentation schématique de deux unités successives d'ADN ribosomique de mammifère. La séquence transcrite par l'ARN polymérase I est indiquée par une boîte bleue. Le promoteur est schématisé par un « P ». Les éléments de pause T1 à T8 sont indiqués en vert, le terminateur proximal T0 est indiqué en rouge.

Reb1 et TTF-I

Reb1 est une protéine essentielle qui est capable de promouvoir la transcription de l'ADNr *in vitro* (Lang et al. 1994). De plus des mutations dans *REB1* s'accompagnent d'un défaut de terminaison *in vivo* (Reeder et al. 1999). Chez les mammifères, le facteur TTF-I (pour Transcription release Factor for Pol I) est capable de promouvoir *in vitro* la terminaison de la transcription en se fixant sur le terminateur T1 (Evers and Grummt 1995).

Les domaines de liaison à l'ADN de Reb1 et TTF-I présentent d'évidentes homologies de séquence. Ils sont situés à l'extrémité C-terminale de chaque protéine et contiennent deux motifs SANT également présents dans l'onco-protéine cMyp, et dans les complexes SWI-SNF et ADA (Ju et al. 1990; Morrow et al. 1993; Aasland et al. 1996). Par ailleurs TTF-I et Reb1 sont interchangeables *in vitro* (Kuhn et al. 1990).

En plus d'interrompre la transcription par l'ARN polymérase I, les protéines Reb1 et TTF-I semblent activer la transcription des copies des ADN_r adjacentes. Ces protéines se fixent non seulement sur le terminateur mais aussi sur une séquence d'environ 200 pb située en amont du promoteur, et nommée terminateur proximal T0 (Vogelauer et al. 1998). En effet, chez la souris et chez *S. cerevisiae* cette séquence semble être importante pour l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase I (Grummt et al. 1986a; Kulkens et al. 1992).

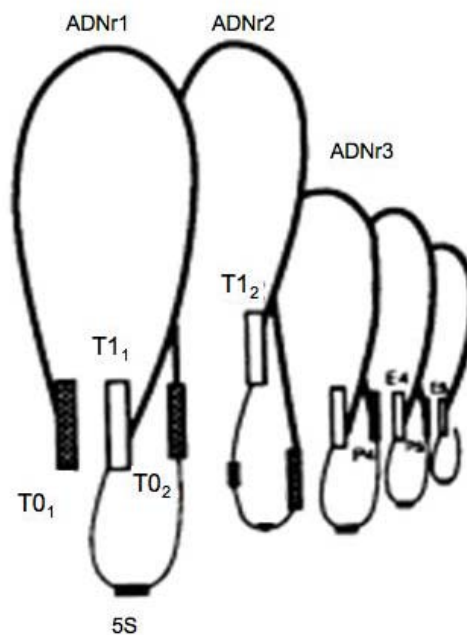


Figure 28 : Implication de la protéine Reb1 dans la ré-initiation de la transcription. La protéine Reb1 est capable de se fixer sur la séquence de terminaison T1 ainsi que sur le terminateur proximal T0. L'oligomérisation des molécules Reb1 situées au niveau des terminateurs T1 et T0 permettrait le rapprochement du site terminaison avec le promoteur de l'ADN_r, ce qui faciliterait la ré-initiation de la transcription par l'ARN polymérase I. Tiré de (Kulkens et al. 1992).

Il a été proposé qu'en se fixant à la fois sur le terminateur T1 et sur le terminateur T0, la protéine Reb1 connecterait le site de terminaison au promoteur de l'unité d'ADN_r suivante afin d'augmenter la vitesse de réinitiation de la transcription par l'ARN polymérase I (Kulkens et al. 1992). Selon ce modèle, chaque unité de transcription formerait une boucle de

manière à rassembler les copies du gène ADN_r d'un côté et les régions intergéniques de l'autre côté (Figure 28). Dans cette conformation la région d'initiation se trouverait à proximité du terminateur T₀ grâce à l'oligomérisation des protéines Reb1 localisées sur ces régions. Les molécules d'ARN polymérase I terminant la transcription d'une unité d'ADN_r pourraient alors être recrutées directement sur le promoteur de l'unité suivante, et la protéine Reb1 serait alors un facteur qui organiserait la structure des unités d'ADN_r afin de faciliter la transcription.

La protéine Reb1 possède d'autres sites de liaison dans le génome. En effet, elle est présente sur les séquences activatrices de gènes tels que *GCN4*, *SIN3*, *ENO1* et au niveau des régions subtélomériques (Wang et al. 1990; Remacle and Holmberg 1992; Carmen and Holland 1994; Berthiau et al. 2006). Il est probable que Reb1 ait plusieurs fonctions. Il serait donc intéressant d'utiliser la technique de « ChIP on chip » pour connaître l'ensemble des gènes occupés par Reb1.

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE III : RESULTATS

Rôle des sous unités spécifiques Rpa49 et Rpa34 dans la fixation et le largage du facteur d'initiation Rrn3

Nous avons vu dans l'introduction que l'ARN polymérase I est formée de 14 sous-unités dont 13 au moins sont conservées chez l'humain. Dix des sous-unités forment un core catalytique hérité des archées puisque, la sous-unité Rbp8 a désormais un homologue archéen bien établi, RpoG (Kwapisz et al. Soumis pour publication). Cependant, les quatre sous-unités Rpa14, Rpa34, Rpa43 et Rpa49 ne sont pas essentielles pour la transcription non-spécifique *in vitro* et sont donc définies comme sous-unités non-catalytiques. Rpa43 et Rpa14 forment un hétérodimère spécialisé dans le recrutement de l'ARN polymérase I. En effet, la transcription du grand précurseur ARNr commence par la fixation du facteur Rrn3 à la sous-unité Rpa43. Puis l'ARN polymérase I-Rrn3 est ensuite dirigée sur le Core Factor composant du complexe de pré-initiation. A la suite de ce recrutement Rrn3 est dissociée de l'ARN polymérase I.

Bien que les sous-unités Rpa34 et Rpa49 aient été découvertes il y a plus de 30 ans par Huet et ses collaborateurs dans l'équipe d'André Sentenac, leur rôle biologique restait mystérieux. Lors de ce travail de thèse nous avons réalisé une étude fonctionnelle sur ces deux sous-unités spécifiques de l'ARN polymérase I. Cette étude montre que Rpa49 favorise le recrutement du complexe ARN polymérase I/Rrn3. Elle est également nécessaire à la dissociation de Rrn3 à la suite du recrutement de l'ARN polymérase I. Cette dissociation est sans doute importante pour l'élongation de la transcription. Enfin, avec la sous-unité Rpa34, Rpa49 forme une hétérodimère au sein de l'ARN polymérase I. Rpa34 optimiserait les fonctions de Rpa49 en favorisant sa stabilité dans l'ARN polymérase I.

Le travail qui suit est donc une continuation d'une première caractérisation des sous-unités Rpa49 et Rpa34, faite au laboratoire (Liljelund et al. 1992; Gadai et al. 1997). Il est principalement basé sur mon propre travail expérimental. Sylvie Labarre a contribué de façon importante à la construction et à la caractérisation génétique des mutants. L'allèle *rpa43-chim2* a été construit par Y. Imazawa et Y. Nogi (Saitama Medical School, Japon). Les mutants *rpa135-L656P* et *rpa135-D395N* ont été isolés par Olivier Gadai durant sa thèse, à partir d'un crible de létalité synthétique avec *rpa34Δ*. Les données de suppression multicopie par Rpa34 reposent sur une observation initiale de Benjamin Albert. L'identification de

Rpa34 comme partenaire double-hybride de Rpa49 provient d'un crible double-hybride réalisé par Magali Goussot, sous la supervision de Michel Werner.

Frédéric BECKOUËT ¹

Sylvie LABARRE-MARIOTTE ¹

Benjamin ALBERT³

Yukiko IMAZAWA ²

Michel WERNER¹

Olivier GADAL^{1,3}

Yasuhisa NOGI ²

Pierre THURIAUX ^{1*}

Two Non-catalytic Subunits of RNA Polymerase I Form a Dimer Controlling the Binding and Release of the Rrn3 Factor during rDNA Transcription

Running head: Yeast RNA polymerase I subunits

(1) CEA, IbiTecS, Service de Biologie Intégrative & Génétique Moléculaire.

Gif/Yvette, F-91191. FRANCE.

(2) Saitama Medical School, Department of Molecular Biology. 38 Morohongo,

Moroyama. Iruma-Gun, Saitama 350-04. JAPAN.

(3) Organisation et Dynamique Nucléaire, LBME-CNRS, Université de Toulouse, 118

route de Narbonne. Toulouse, F-31000. FRANCE.

* Corresponding author

Tel: +33 1 69 08 35 86

Fax: +33 1 69 08 47 12

E-mail: pierre.thuriaux@cea.fr

ABSTRACT

Rpa34 and Rpa49 are non-catalytic subunits of RNA polymerase I (Pol I) conserved from yeast to man. Rpa34 binds a conserved domain between positions 63 and 119 of Rpa49 and this stabilises Rpa49 onto Pol I. Conversely, the *rpa49-119,416* N-terminal deletion, with no binding domain, fails to recruit Rpa34 onto Pol I. *rpa34Δ* grows like a wild type but is synthetic lethal with *top1Δ* (lacking a type I DNA topoisomerase) and with *rpa135-L656P* or *rpa135-D398N*, two viable but mycophenolate-sensitive Pol I mutants. These defects are suppressed by over-expressing Rpa49, further arguing for a close functional interaction between Rpa34 and Rpa49. *in vivo*, Rpa49 is critical for regulating the binding and release of Rrn3 during initiation and elongation. *rpa49Δ* (or an *rpa49::HIS3* mutant lacking the conserved C-terminal end of Rpa49) partly impairs the recruitment of Rrn3 to the rDNA promoter, but this defect is bypassed by the *rpa43 35,326* N-terminal deletion. These *rpa49* mutants are also unable to release the Rrn3 initiation factor from the elongating Pol I, and fully dissociate the elongating Pol I from its rDNA template. Rpa49, combined with Rpa34, therefore appears to facilitate Pol I recruitment and to convert it into an elongation-competent form lacking Rrn3.

KEYWORDS: 6-azauracil / Hmo1 / Nucleolus / Rrn7 / Rrn9 / Transcription

INTRODUCTION

Fast-growing yeast cells have an active ribosome biogenesis, and mobilise some 70% of their transcriptional capacity to produce the 6.8 Kb precursor of the 18S, 5.8S and 25S ribosomal RNAs by transcribing the highly repeated rDNA locus (Nomura, 1999; Rudra and Warner, 2004). Genetic studies (Nogi et al., 1991) have established that this is the only or, at least, the only essential role of yeast RNA polymerase I (Pol I). rDNA transcription starts with the binding of Pol I to its specificity factor Rrn3/TIF-IA (Bodem et al., 2000; Milkereit and Tschochner, 1998; Miller et al., 2001; Moorefield et al., 2000; Peyroche et al., 2000; Yamamoto et al., 1996). The Rrn3-Pol I dimer is then directed to a pre-initiation complex residing at the rDNA promoter region. This complex combines the TATA box binding protein, shared with the Pol II and Pol III systems (Hernandez, 1993) with the Core and Upstream Activation Factors that are specific of the Pol I system (Keys et al., 1996; Keys et al., 1994). In mammals, Pol I first binds TIF-IA, closely related to Rrn3 (Bodem et al., 2000; Miller et al., 2001) and functionally interchangeable with that protein *in vivo* (Moorefield et al., 2000). The Pol I/TIF-IA dimer is then targeted to the rDNA promoter by interacting with SL1, a factor made of the TATA box binding protein associated with four protein subunits, TAF₉₅, TAF₆₈, TAF₄₈ and TAF₄₁ (Comai et al., 1992; Gorski et al., 2007; Grummt, 2003; Miller et al., 2001; Zomerdijk et al., 1994), where TAF₆₈ is distantly related to the Rrn7 subunit of the yeast Core Factor (Boukhgalter et al., 2002). Pol I is also associated to UBF (mammals) and Hmo1 (yeast), two distantly related HMG box proteins that stimulate rDNA transcription by a still poorly understood mechanism (Gadal et al., 2002; Panov et al., 2006a; Stefanovsky et al., 2001).

Pol I is a very complex enzyme made of fourteen polypeptides in *Saccharomyces cerevisiae* (Carles et al., 1991; Gadal et al., 1997; Huet et al., 1975) and *Schizosaccharomyces pombe* (Aslett and Wood, 2006; Imazawa et al., 2005). Twelve of them are related or even identical to Pol II (Armache et al., 2003) and to the Pol III core structure (Fernandez-Tornero et al., 2007; Jasiak et al., 2006) and are homologous to archaeal RNA polymerase subunits (Langer et al., 1995; Werner and Weinzierl, 2002). Five of these subunits, including the two largest ones, are also homologous to the bacterial core enzyme (Zhang et al., 1999). Rpa49 and Rpa34, on the other hand, are Pol I-specific subunits of unknown function (Gadal et al., 1997; Liljelund et al., 1992) that are also homologous to PAF53 and PAF49 in the mammalian Pol I system (Panov et al., 2006b; Yamamoto et al., 2004). We show here that they bind each other in the

Pol I structure and play an important role in transcription by improving the recruitment of the Rrn3-Pol I complex to the rDNA and by triggering the release of Rrn3 from the elongating Pol I.

RESULTS

Pol I-specific subunits Rpa49 and Rpa34 are conserved and bind each other

The *rpa49Δ* null allele is viable (Liljelund et al., 1992; Nakagawa et al., 2003), but fails to grow at low temperature (25°C), is sensitive to mycophenolate and is lethal in cells lacking the non-essential Rpa14 subunit or the HMG box protein Hmo1 (Desmoucelles et al., 2002; Gadai et al., 2002; Gadai et al., 1997). Rpa49 has close homology to the human PAF53 protein (Figure 1A) and can be replaced *in vivo* by Rpa41, its *S. pombe* counterpart (Nakagawa et al., 2003). Homology search revealed an Rpa49-like gene product in most eukaryotic genomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), with four conserved motifs corresponding to positions 60-89, 123-154, 201-216 and 326-371 in *S. cerevisiae* (Figure S1). Rpa34 is less conserved, but similar proteins have been identified in fission yeast, mouse and man (Aslett and Wood, 2006; Panov et al., 2006b). As shown in Figure S1, these proteins are characterized by two conserved internal domains and by C-terminal KKE/D repeats typical of several nucleolar proteins [Gautier, 1997 #6508].

Like all other Pol I subunits (Flores et al., 1999), Rpa49 and Rpa34 were included in a genome-wide screen based on Gal4_{BD} fusions that were tested against a library of genomic fragments fused to the Gal4_{AD} activation domain. The Gal4_{BD}::Rpa49 screen yielded two Gal4_{AD} clones encoding the entire Rpa34 subunit (Figure 1B), whereas the Gal4_{BD}::Rpa34 fusion yielded six clones overlapping between positions 63 and 119 of Rpa49. N-terminal (*rpa49-63,416*, *rpa49-89,416*, *rpa49-119,416*) and C-terminal (*rpa49-1,260*, *rpa49-1,366*) deletions confirmed that the Gal4_{BD}::Rpa34 x Gal4_{BD}::Rpa49 interaction was lost by deleting the 63/119 segment of Rpa49 (Figure 1C).

The genome-wide screening made with the Gal4_{BD}::Rpa34 bait also yielded two Top1 clones, suggesting that the synthetic lethality of *rpa34Δ* and *top1Δ* (Gadai et al. et al. 1997) may involve a direct Top1-Rpa34 binding. Intriguingly, this screen also produced four clones encoding Gno1 (two isolates), Nop56 and Nop58, respectively. These three proteins are nucleolar and, like Rpa34 contain KKD/E repeats. Gno1 contributes to the first cleavage steps

of pre-rRNA processing (Guglielmi and Werner, 2002). Nop56 and Nop58 are components of the U3 ribonucleoprotein complex required for 18S rRNA biogenesis (Dragon et al., 2002).

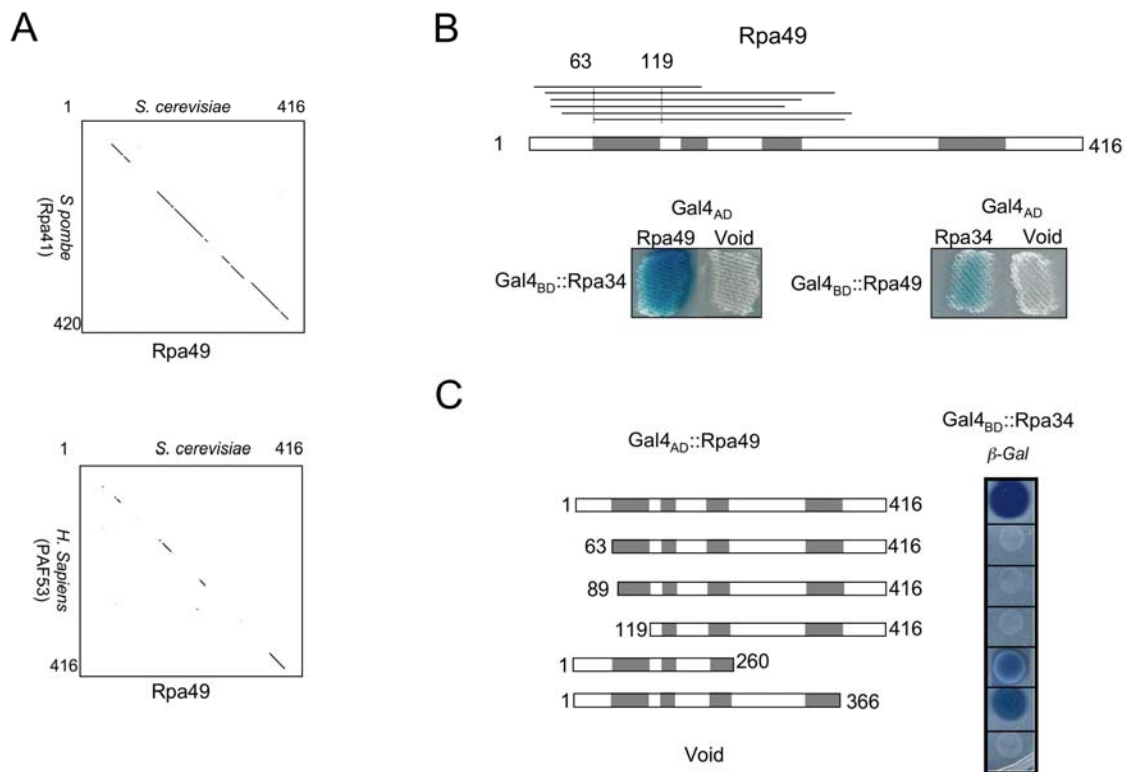


Figure 1. Properties of the Rpa49 subunit. (A) Sequence conservation. The homology of Rpa49 to its human (PAF53) and *S. pombe* (rpa41) counterparts is represented by Blosum 62 matrices at a 5/35 stringency, drawn with the DNA Strider 1.4f6 software (Marck, 1988). (B) Genome-wide screening with Gal4_{BD}::RPA34 and Gal4_{BD}::RPA49. Six Gal4_{AD}::RPA49 plasmids were isolated from a previously described two-hybrid library (Flores et al., 1999), using a Gal4_{BD}::RPA34 bait. Thin lines denote the limits of the *RPA49* inserts. β -galactosidase was tested as previously described (Flores et al., 1999). Data are shown for the Gal4_{AD}::RPA49(36,119) plasmid and for a reciprocal two-hybrid interaction between Gal4_{BD}::RPA34 and Gal4_{AD}::RPA49. The *RPA49* open reading frame is shown with grey boxes representing four conserved parts of Rpa49, corresponding to positions 60-89, 128-154, 201-216 and 326-371 in *S. cerevisiae*. (C) Deletion mapping of the Rpa34-interacting domain on Rpa49. N-terminal and C-terminal deletions of Rpa49 were cloned as Gal4_{BD}:: fusions to the pVV213 vector and tested against Gal4_{BD}::RPA34 in a two-hybrid assay.

Rpa49 ensures the binding of Rpa34 to Pol I

A Pol A* form lacking subunits Rpa34 and Rpa49 was obtained from purified Pol I, showing that Rpa34 and Rpa49 are comparatively labile components of Pol I (Huet et al., 1975). Moreover, Rpa49 readily dissociates from the purified *rpa34Δ* mutant Pol I, suggesting that these two subunits may stabilise each other in the Pol I structure (Gadal et al., 1997). Indeed, Rpa34 lacked from Pol I when this enzyme was immuno-purified from the cell-free extract of

an *rpa190::HA rpa49Δ* double-mutant (Figure 2A). We also investigated the association of these subunits with rDNA by chromatin immuno-precipitation in *rpa34Δ* or *rpa49Δ*. Rpa34 was entirely lost of the rDNA-bound Pol I in *rpa49Δ* or of an N-terminal deletion (*rpa49-119,416*) lacking the putative Rpa34-binding domain (Figure 2B), whereas *rpa34Δ* had a slightly reduced Rpa49 signal in ChIP assays (Figure 2C). Thus, Rpa49 is strictly needed to bind or stabilise Rpa34 onto Pol I and this involves an Rpa34-binding domain minimally defined by the 63/119 segment of Rpa49. In contrast, Rpa34 is not required to bind Rpa49, but may stabilise this subunit in the Pol I structure.

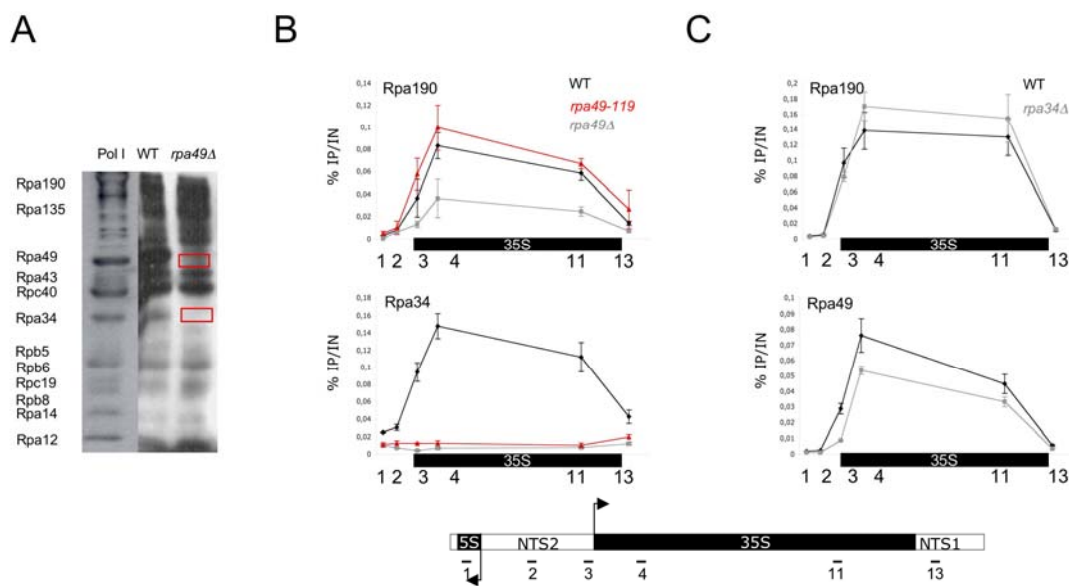


Figure 2. Physical interaction between Rpa34 and Rpa49. (A) Loss of Rpa34 in an *rpa49Δ* background. Pol I was immuno-precipitated from cell-free extracts of YBF51 (*RPA190::HA rpa49Δ*) and its isogenic wild-type control (WT), obtained by transformation with pFB74 (*URA3 RPA49⁺*). The cell-free extracts were prepared using a French press, as previously described (Van Mullem et al., 2002). Individual subunits (except the two smallest ones, Rpb10 and Rpb12) were identified by comparison with a purified Pol I preparation (Pol I) kindly provided by C. Carles and M. Riva. The missing Rpa49 and Rpa34 subunits of YBF51 are boxed in red. (B) Effect of *rpa49* mutants on the binding of Rpa34 to Pol I. Strains D704-6C was transformed with pVV200 plasmids bearing the mutant (*rpa49-119,416*) and wild type *RPA49* alleles. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were done on three independent cultures (100 mL of YPD) harvested at an A_{600} absorbance of 0.6. Pol I was revealed by polyclonal anti-Rpa190 and anti-Rpa34 rabbit antibodies (Riva et al., 1986). DNA occupancy is defined by the ratio between the IP signal and the DNA input signal. The diagram below shows the approximate positions of the primers used for RT-PCR amplification (Table 1, Supporting Information). The start site and transcription orientation of the 5S and 35S rRNA transcripts are denoted by arrows. The non-transcribed spacers NTS1 and NTS2 are indicated by horizontal bars. (C) Effect of *rpa34Δ* on the binding of Rpa49. ChIP assays were done on strains YPH499 (WT) and T4-1C (*rpa34Δ*) using polyclonal anti-Rpa190 and anti-Rpa49 rabbit antibodies (Riva et al., 1986).

The synthetic lethal effects of *rpa34Δ* are suppressed by Rpa49 over-expression

Rpa34 is largely dispensable *in vivo* since *rpa34Δ*, unlike *rpa49Δ*, has no detectable growth defect and is not particularly sensitive to mycophenolate or to 6-azauracil (Figure 3A). Moreover, it only shows a slight growth defect when combined with *hmo1Δ* (Gadal et al., 2002). However, *rpa34Δ* and *rpa49Δ* are both synthetic lethal with *rpa14Δ* (Gadal et al., 1997). Using an *ad hoc* selection screen (Material and Methods) or re-investigating previously described cases of synthetic lethality with *rpa34Δ*, we looked for additional synthetic lethal mutants acting on *rpa34Δ* and *rpa49Δ*. As summarised in Figure 3B, *rpa34Δ* and *rpa49Δ* were synthetic lethal with *top1Δ*, with the temperature-sensitive *rrn3-8* mutant and with two Pol I mutants (*rpa135-L656P* and *rpa135-D395N*) that grow like wild type but are moderately (*rpa135-D395N*) or strongly (*rpa135-L656P*) sensitive to mycophenolate and 6-azauracil. However, we were unable to reproduce an synthetic lethality previously reported between *rpa34Δ* and chitin synthase defective mutants (Tong et al., 2001).

Rpa34, therefore, is not entirely dispensable *in vivo*, as *rpa34Δ* presents a small number of synthetic lethal defects that are invariably shared with *rpa49Δ*. These synthetic effects are largely specific of *rpa34Δ* and *rpa49Δ*, since they were not seen in the *rpa12Δ* and *rpa14Δ* mutants inactivated for the other two dispensable subunits of Pol I. Moreover, the lethal defects between *rpa34Δ* and *rpa135-L656P*, *rpa135-D395N* or *top1Δ* were suppressed when over-expressing Rpa49, indicating that they are mediated by Rpa49 and not by Rpa34 itself (Figure 3C). This strongly argues that Rpa34 alters the spatial organisation of its Rpa49, therefore stabilising this subunit in the Pol I structure.

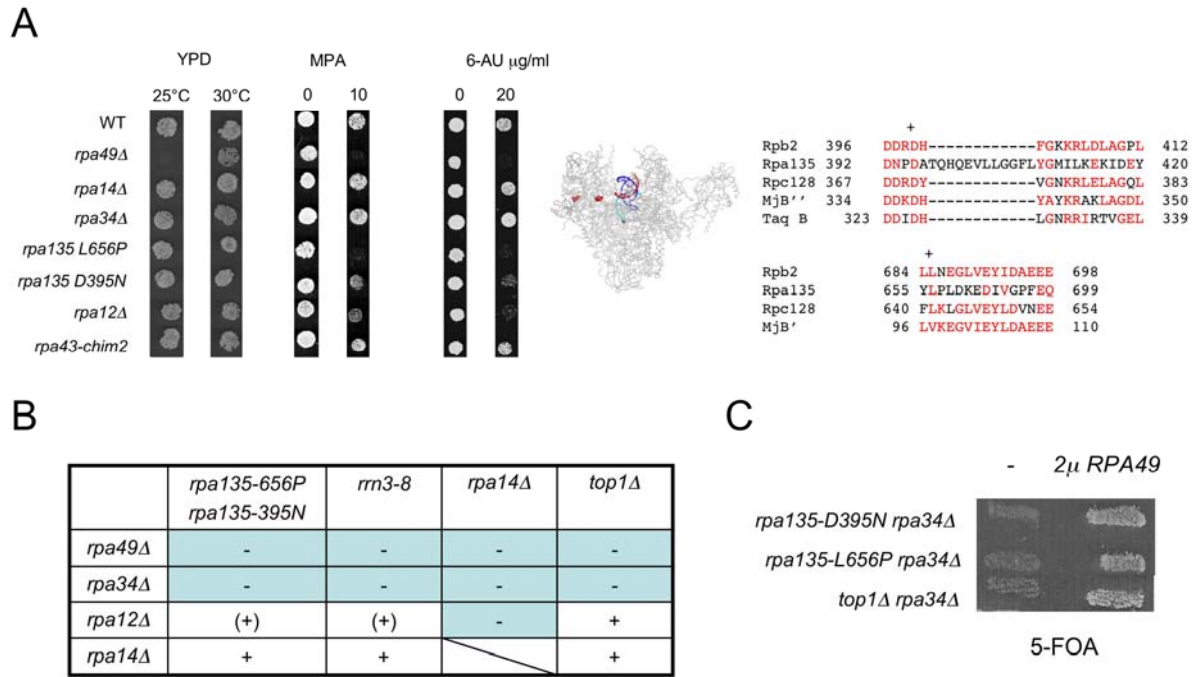


Figure 3. Growth defects of *rpa49 Δ* and *rpa34 Δ* . (A). Sensitivity of RNA polymerase I mutants to mycophenolate and 6-azauracil. Freshly grown cells from strains YPH499 (WT), D704-6C (*rpa49 Δ*), D360-1A (*rpa14 Δ*), T4-1C (*rpa34 Δ*), OG36-1A (*rpa135-L656P*), SL46-1D (*rpa135-D395N*), SL9-2C (*rpa12 Δ*) and D101-CHIM2 (*rpa43-chim2*) were serially diluted and spotted on Synthetic Complete (SC) lacking uracil but containing mycophenolate or 6 Azauracil (6-AU) at the concentrations indicated. Plates were incubated for three days at 30°C. The conservation and spatial organisation of the *rpa135-D395N* and *rpa135-L656S* mutations is based on a comparison of the Rpa135 (Pol I), Rpb2 (Pol II) and Rpc128 (Pol III) subunits of *S. cerevisiae*, of the corresponding archaeal subunits (B' and B'') of *Methanocaldococcus jannaschii* and of the bacterial β subunit of *Thermus aquaticus* (Taq). The corresponding Rpb2 positions are indicated on the Pol II crystal structure, as taken from the 1WCM coordinates at the PDB databank (Armache et al., 2003). (B) Synthetic growth defects. In the case of *rrn3-8*, lethality was inferred from tetrad analysis involving at least ten tetrads in each crosses. In all other cases, synthetic defects were monitored by a plasmid shuffle assay (Boeke et al., 1984) based on the counter-selection of plasmid pFB74 (*RPA49 URA3*) on FOA medium. The appropriate host cells were transformed with the *TRP1 RPA49* plasmid pVV200-A49 and with pVV200 as empty plasmid control (see Materials and Methods). Lethality is indicated by (-). Mutant strains that grew on FOA were streaked on YPD for three days at 30°C. The + and (+) symbols denote a growth pattern identical or partly impaired relatively to the corresponding wild-type control tested before the FOA chase. (C) Suppression of synthetic lethal defects associated to *rpa34 Δ* . Strains OG1-L656P, OG1-D39N and OG17-1C bearing the pOG1-A34 plasmid (2 μ *RPA34 URA3*) were transformed with pGEN-A49 (2 μ *RPA49 TRP1*), using pGEN as an empty vector control. Suppression was detected by a plasmid shuffle assay on FOA, as described above.

The conserved C-end of Rpa49 is critical *in vivo*

Rpa49 mutants were constructed by progressive deletions of the N- and C-end of Rpa49 (Figure 4A). Deleting the first 89 amino acids of Rpa49 (*rpa49-63,416* and *rpa49-89,416*) had no adverse effects in any condition tested, despite the strongly conserved motif between positions 60 and 90 (Figure S1). *rpa49-119,416*, removing the next twenty amino acids, had a wild-type phenotype but was nearly lethal with *rpa14Δ*, consistent with the data discussed above (Figure 2) showing that Pol I is unable to recruit the Rpa34 subunit. The C-terminally truncated *rpa49::HIS3* mutant, on the other hand, behaved like *rpa49Δ*, with an almost complete growth defect at 25°C, a strong sensitivity to mycophenolate or 6-azauracil and a synthetic lethality with *rpa14Δ* or *hmo1Δ*. The corresponding mutant subunit lacks the last 77 amino acids but remains stably bound to Pol I (Liljelund et al., 1992). A somewhat shorter C-terminal deletion, *rpa49-1,366*, also failed to grow at 25 °C, but had a slightly milder drug sensitivity and was viable in *hmo1Δ*. The importance of the Rpa49 C-terminal domain was also underscored by chromatin immuno-precipitation (ChIP) assays, with a strongly reduced Pol I occupancy of rDNA in *rpa49Δ* and *rpa49-1,366* (Figure 4B).

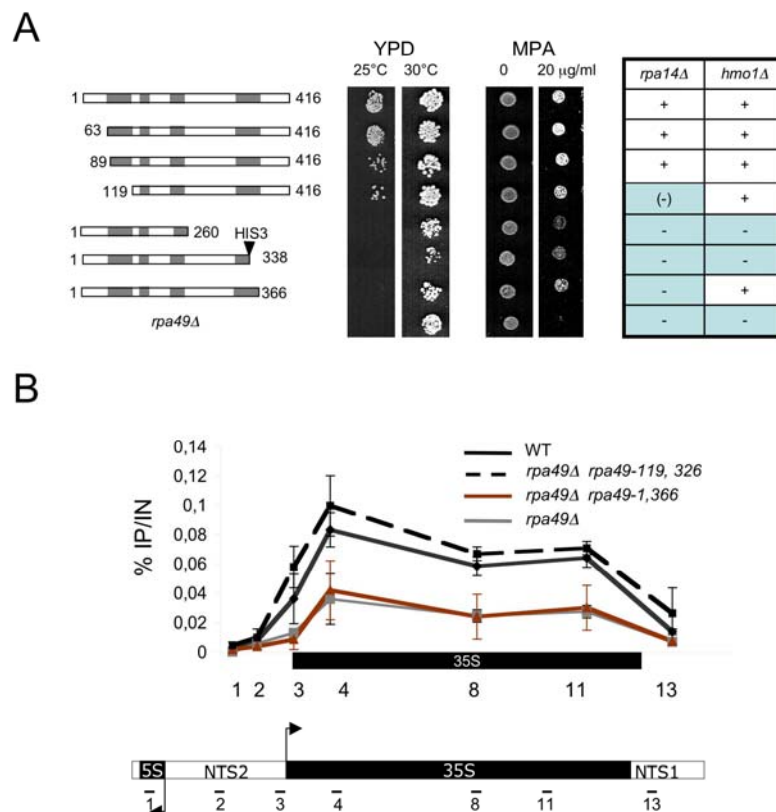


Figure 4. Mutagenesis of *RPA49*. (A) Growth defects of *rpa49* mutants. Strain D704-7C (*rpa49Δ*) was transformed with pVV200 plasmids (Van Mullem et al., 2003) bearing the relevant wild-type and *rpa49* mutants corresponding to progressive N- and C-terminal

deletions. Plasmid pVV214 was used as empty control. Strain 49::HIS3 (Table 1, supporting information) was used to test the *rpa49::HIS3* allele, where the *HIS3* insertion interrupts the Rpa49 coding sequence at H338, with an GSAARSCSLACT extension beyond position H338 (Liljelund et al., 1992). The grey boxes represent four conserved parts of Rpa49, corresponding to positions 60-89, 123-154, 184 and 326-371 in *S. cerevisiae*. Yeast cultures were serially diluted and spotted on YPD (25°C and 30°C) or Synthetic Complete (SC) with mycophenolate at 20 µg/ml. Plates were incubated at 30°C for three days. The synthetic lethality of *rpa49* mutants was tested in strains D699-13C (*rpa14Δ rpa49Δ*), D684-2B (*hmo1Δ rpa49Δ*) bearing the pFB74 (*RPA49 URA3*) plasmid and transformed with the same pVV200-derived plasmids as above. The resulting transformants were replica plated on FOA medium to chase pFB74. Synthetic lethal effects were revealed by the lack of growth on FOA (Boeke et al., 1984). In the case of *rpa49::HIS3*, synthetic lethality was deduced from meiotic crosses based on twelve tetrads. **(B)** Effect of *rpa49* mutants on rDNA occupancy by Pol I. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were done on D704-6C (*rpa49Δ*) as described above. Pol I was revealed by polyclonal anti-Rpa190 rabbit antibodies (Riva et al., 1986). DNA occupancy is defined by the ratio between the IP signal and the DNA input signal. The diagram below shows the approximate positions of the primers used for RT-PCR amplification (Table 1, Supporting Information). The start site and transcription orientation of the 5S and 35S rRNA transcripts are denoted by arrows. The non-transcribed spacers NTS1 and NTS2 are indicated by horizontal bars.

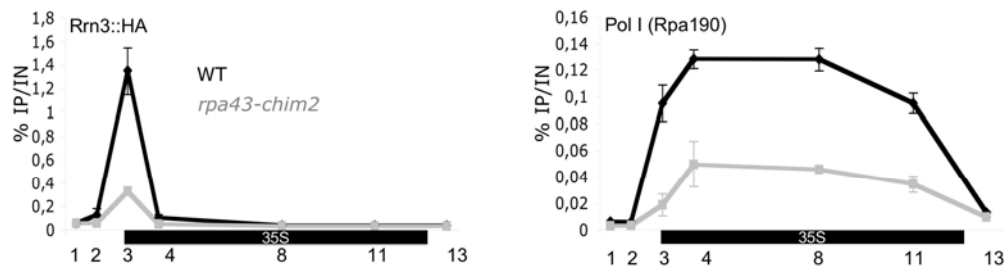
***rpa49* mutants fail to release Rrn3 from the elongating Pol I**

ChIP assays have shown that the Rrn3 protein is present on the rDNA promoter but not on the rDNA 3'-end, as befits a Pol I-associated initiation factor (Bier et al., 2004). Our own ChIP data showed that Rrn3 is restricted to the promoter region, thus supporting the idea that Rrn3 is released from rDNA (and therefore from Pol I) at the onset of transcription (Figure 5A). To know if and how *rpa49* mutants might affect the distribution of Rrn3, we introduced the *rrn3::HA* tagged allele in *rpa49Δ* and in the null-like *rpa49::HIS3* allele. As a control, we used *rpa43-chim2*, a temperature sensitive mutant constructed by domain swapping between *S. cerevisiae* and *S. pombe*, and altering the most conserved part of Rpa43 (Figure 5B). When grown on YPD at 30°C, *rpa43-chim2*, *rpa49Δ* and *rpa49::HIS3* have reduced doubling times of 180-200 min, compared to 90-100 min in isogenic wild type cells. *rrn3::HA* grew like a wild type and did not amplify the growth defect of the *rpa49* or *rpa43* mutants tested.

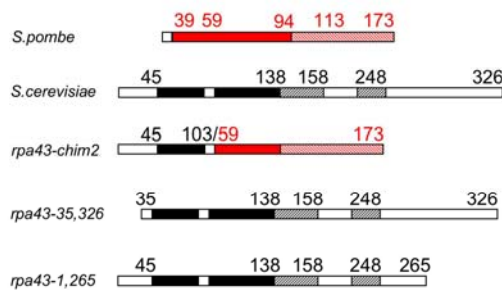
rpa43-chim2 strongly reduced Rrn3::HA occupancy at the rDNA promoter, with a parallel effect on Pol I (Figure 5A). This was consistent with the fact that Rpa43 is the main Rrn3 target on Pol I (Laferté et al., 2006; Peyroche et al., 2000), but we also noted a slight but significant effect on the Core Factor (Rrn7::HA), with no effect on the UAF (Rrn9::HA), as shown in Figure 5C. This suggests that Rpa43, probably through its interaction with Rrn3, may stabilise the Core Factor at the rDNA promoter (Aprikian et al., 2001). As shown in Figure 6, the effects of *rpa49Δ* and *rpa49::HIS3* were more complex than those of *rpa43-*

chim2. These two mutants decreased the Rrn3::HA signal at the promoter, though less than *rpa43-chim2*. However, they also retained Rrn3 on the whole Pol I-transcribed region, with no detectable effect on the core and upstream activating factors. In contrast to the wild type situation where Rrn3 is released from Pol I when the latter escapes from the promoter, this release is therefore defective in mutants lacking Rpa49 or, more precisely, lacking the conserved C-terminal part lost in *rpa49::HIS3*.

A



B



C

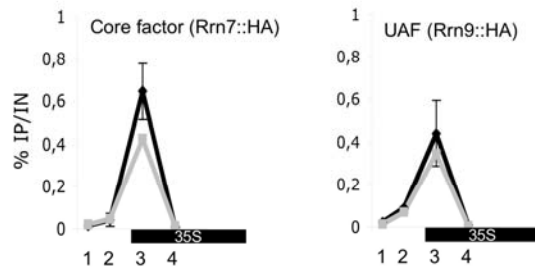


Figure 5. Effect of *rpa43-chim2* on Rrn3. (A) Rrn3 and Pol I occupancy. ChIP assays were done on strains SL97-17C (*rpa43Δ RRN3::HA*) using the same conditions as above. Rrn3::HA and Pol I were revealed by 12CA5 and polyclonal anti-Rpa190 rabbit antibodies (Riva et al., 1986), respectively. (A) Schematic representation of the *rpa43* mutants. *rpa43-chim2* was constructed by domain swapping between *S. pombe* and *S. cerevisiae*. *rpa43-35,326* and *rpa43-1,265* were constructed by PCR amplification. Filled and striped boxes represent Rpb7-like and Pol I specific domains of Rpa43, respectively. Numbers denote amino-acid positions and correspond to the limits of the domains swapped between *S. cerevisiae* and *S. pombe* (*rpa43-chim2*) or removed in the N and C-terminal deletions. (B) Rrn7 and Rrn9 occupancy. ChIP assays were done on strains SL105-7A (*rpa43Δ RRN7::HA*), and SL106-7A (*rpa43Δ RRN9::HA*), bearing plasmids pGEN-A43 (wild type) or pGA43-*chim2* (*rpa43-chim2*), using the same conditions as above. Rrn7::HA and Rrn9::HA were revealed with anti-hemagglutinin A mouse antibodies (12CA5).

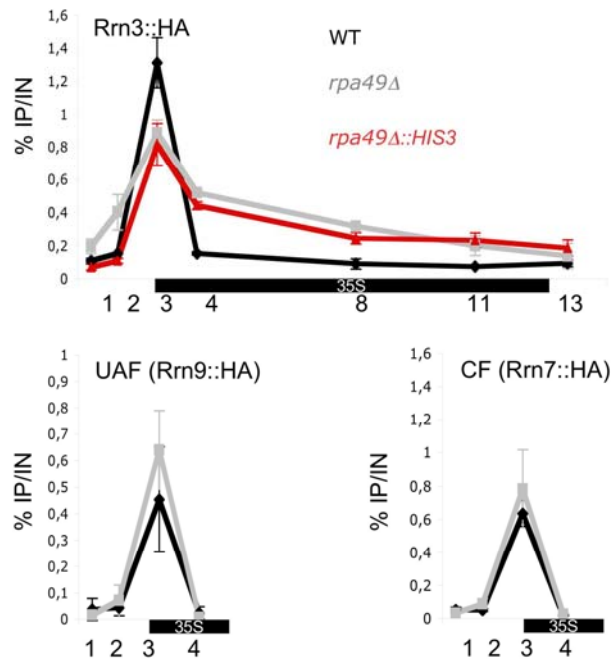


Figure 6. Effects of *rpa49Δ* and *rpa49::HIS3* mutants on rDNA occupancy by Rrn3. The upper panel shows Rrn3::HA assays made in strains SL112-1C (*rpa49Δ*), D612-5A (*rpa49::HIS3*) and SL112-1C, complemented by plasmid pFB74 (WT), using the same experimental conditions as in Figure 1C and 2. The lower panels show Rrn7::HA and Rrn9::HA ChIP assays made in strains D574-1B (*rpa49Δ RRN9::HA*), SL111-4A (*rpa49Δ RRN7::HA*) and their isogenic wild-type controls obtained by complementation with plasmid pFB74.

Pol I and Rrn3 are lost from rDNA in *rpa49* mutants exposed to mycophenolate.

In addition to their mycophenolate sensitivity, *rpa49Δ* and *rpa49::HIS3* also strongly respond to 6-azauracil (Figure 3) another drug known to inhibit the synthesis of NTP's (Exinger and Lacroute, 1992). As already mentioned, two other Pol I mutants grew like wild type but had a strong (*rpa135-L656P*) or moderate (*rpa135-D395N*) sensitivity to mycophenolate and 6-azauracil (Figure 3A). Sensitivity to 6-azauracil has also been described for *rpa135-D784G*, altering the Pol I active site (Schneider et al., 2007). However, this is not a general property of Pol I-defective mutants, since *rpa14Δ*, *rpa34Δ* and all of the *rpa43* mutants described so far have a wild type response to these two drugs (Figure 3A and data not shown).

Mycophenolate notably altered the distribution of Pol I on rDNA, with an increased amount at the promoter region and a decreased probability of entering transcription itself (Figure 7). The *rpa43-chim2* mutant responded like the wild type, consistent with its normal sensitivity to mycophenolate *in vivo*, thus further supporting the idea that is mutant only impairs the recruitment of Pol I to the rDNA promoter, prior to transcription itself. The mildly sensitive

rpa12Δ mutant (Van Mullem et al., 2002) also essentially behaved like wild-type. In contrast, *rpa49Δ*, *rpa49::HIS3* and *rpa135-656P* almost completely lost Pol I in response to mycophenolate, consistent with their strong sensitivity *in vivo*.

We have seen above that, in wild type, Rrn3 is only found the rDNA promoter region. Figure 8 shows that this restricted occupancy was not affected by mycophenolate, which supports the idea that Rrn3 binds (and leaves) the promoter region prior to transcription starts, and is thus independent of the availability of NTPs. There was also no effect on the Core Factor (Rrn7). In contrast, *rpa49Δ* and *rpa49::HIS3* massively lost Rrn3, but again with no effect on Rrn7. Rrn3 thus followed the fate of Pol I itself, further supporting the view that it remains physically bound to Pol I in *rpa49* mutants. This, however, is not a general property of elongation-defective mutants since *rpa135-L565P* had a wild type response in terms of Rrn3 occupancy and is thus able to release Rrn3 from Pol I.

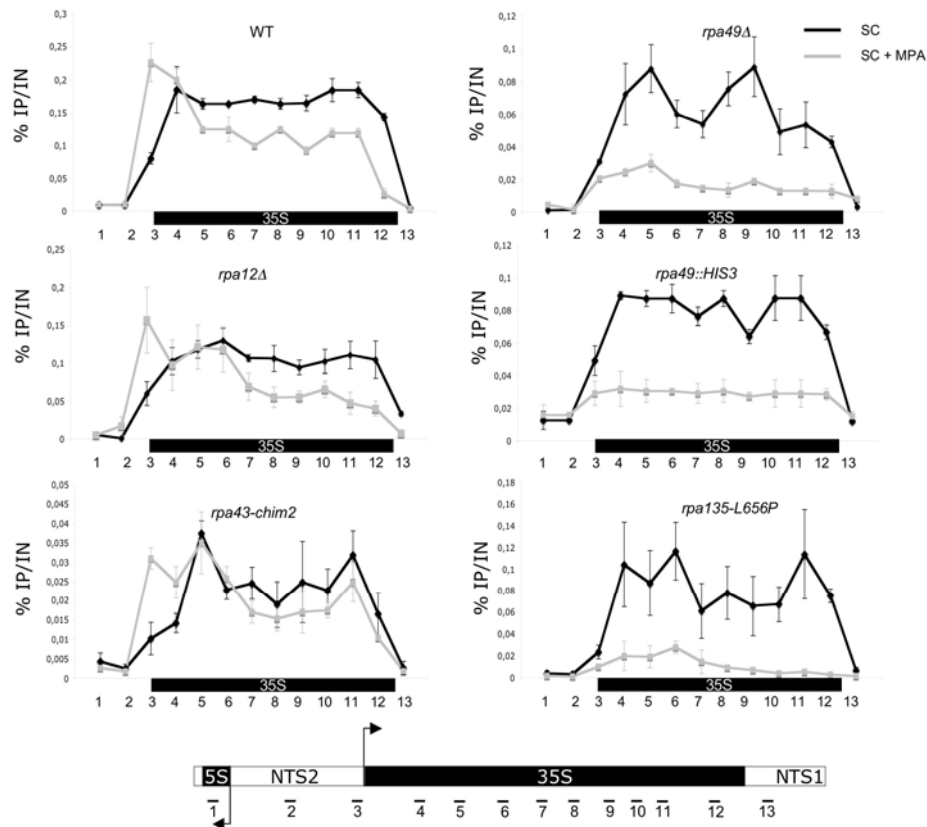


Figure 7. Effect of mycophenolate on rDNA occupancy by Pol I in WT, *rpa49Δ*, *rpa49::HIS3*, *rpa12Δ*, *rpa43-chim2* and *rpa135-L656P*. Cells were cultivated in SD +aa until they reached an A_{600} of 0.2, where they were treated (or left untreated) with 20μg/ml of mycophenolate and further grown for 30 minutes. In the case of Pol I, ChIP assays were done on strains SL97-17C (*rpa43::LEU2 rrn3::HA /YCPA43*), used here as wild type control, D101-chim2 (*rpa43-chim2*) and SL29-2C (*rpa12Δ*) SL112-1C (*RRN3::HA rpa49Δ*), SL107-3B (*RRN3::HA rpa49::HIS3*) and OG36-1a (*rpa135-L656P*), Five additional primers (5, 6, 7, 9, 10) were used for RT-PCR amplification and are listed in Table S2.

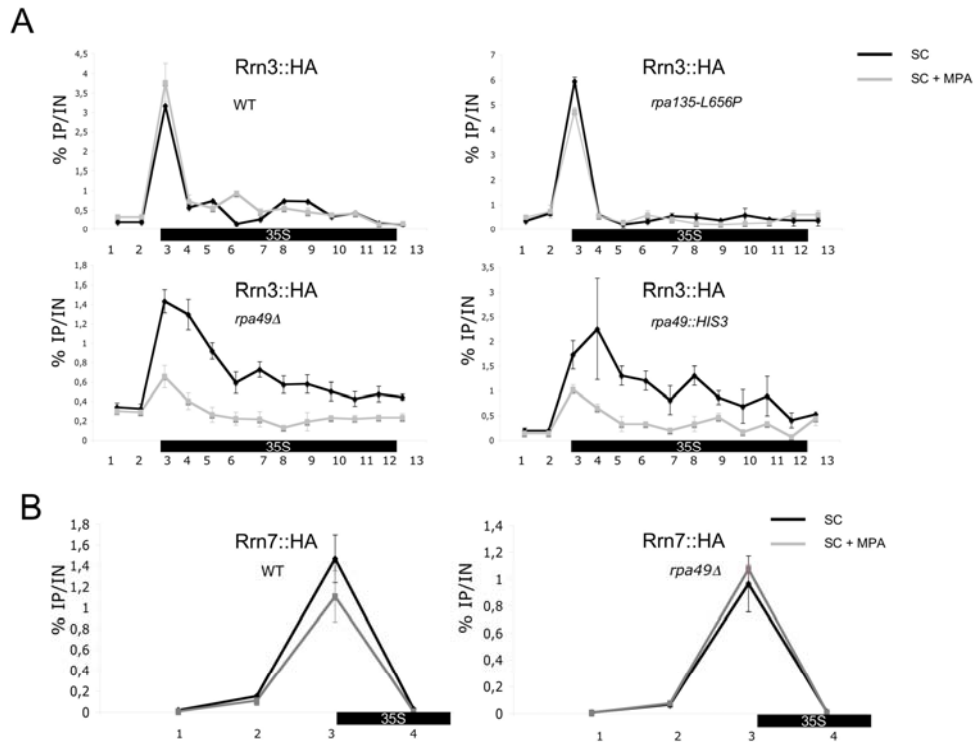


Figure 8. Effect of mycophenolate on rDNA occupancy by Rrn3 and Rrn7 in Pol I elongation mutants. (A) Effect on Rrn3::HA. ChIP assays were done on strains SL112-1C (*RRN3::HA rpa49Δ*), SL107-3b (*RRN3::HA rpa49::HIS3*), and D769-2C (*RRN3::HA rpa135-L656P*), using the experimental set-up of Figure 7, that also provides corresponding wild type data. (B) Effect on Rrn9::HA. ChIP assays were done on strain SLL11-4A (*RRN7::HA3::KanMX4 rpa49Δ::TRP1*) transformed with the pFB74 (URA3 RPA49) plasmid.

An *rpa43* mutant suppresses the cold-sensitive defect of *rpa49* mutants

Rpa43 is about twice larger in *S. cerevisiae* than in *S. pombe*, due to N-terminal and C-terminal extensions flanking a highly conserved central domain. The latter is comprised between positions 45 and 248 in *S. cerevisiae* and forming the entire Rpa43 in *S. pombe* or indeed in most other eukaryotes (see Figure 5). Every lethal or conditional *rpa43* mutant identified so far, including the *rpa43-chim2* mutant described above, changed this conserved domain (Peyroche et al., 2000; Thuriaux et al., 1995), and these mutants are invariably lethal when combined with *rpa49Δ* (this study). Deletions removing the non-conserved parts of Rpa43 have no detectable growth defect and, in the case of the long C-terminal extension (*rpa43-1,265*) also have no adverse effect on *rpa49Δ*. However, *rpa43-35,326*, deleting the non-conserved N-end of Rpa43, acted as a gain-of-function mutant suppressing the cold-sensitivity of *rpa49* mutants (Figure 9A). Consistent with this suppression, Pol I occupancy was restored to a nearly wild type level. This coincided with a better Rrn3 occupancy, but

rpa43-35,326 had little or no effect on the mycophenolate sensitivity of *rpa49* mutants and, strikingly, did not change their defective Rrn3 release (Figure 9B).

These suppression data argue that *rpa49* mutants have a dual effect on Rrn3, by interfering with its recruitment during transcription initiation and by preventing its release from the elongating Pol I. Importantly, this suppression suggests that the growth defect of *rpa49Δ* is primarily due to its defective Rrn3 recruitment, possibly reflecting a direct functional interaction of Rpa49 with the N-end of Rpa43, where the latter would impair the recruitment of Rrn3 and enhance the effect of *rpa49* mutants. The defect in Rrn3 release, on the other hand, is independent of *rpa43-35,326* and correlates with a strong sensitivity to mycophenolate, thus suggesting that Rpa49 converts Pol I into an elongation-proficient form lacking Rrn3. Preventing Rrn3 to leave the elongating Pol I is nevertheless be compatible with transcription, since an *rrn3::rpa43* fusion inserting Rrn3 in front of Rpa43 was recently shown to bypass the lethality of an *rrn3Δ rpa43Δ* double-mutant, at least when overproduced from a multi-copy vector (Laferté et al., 2006). This fusion, however, is lethal and thus unable to support transcription when combined with *rpa49Δ* or *rpa49::HIS3*, and grows very poorly when combined with *rpa34Δ* (data not shown).

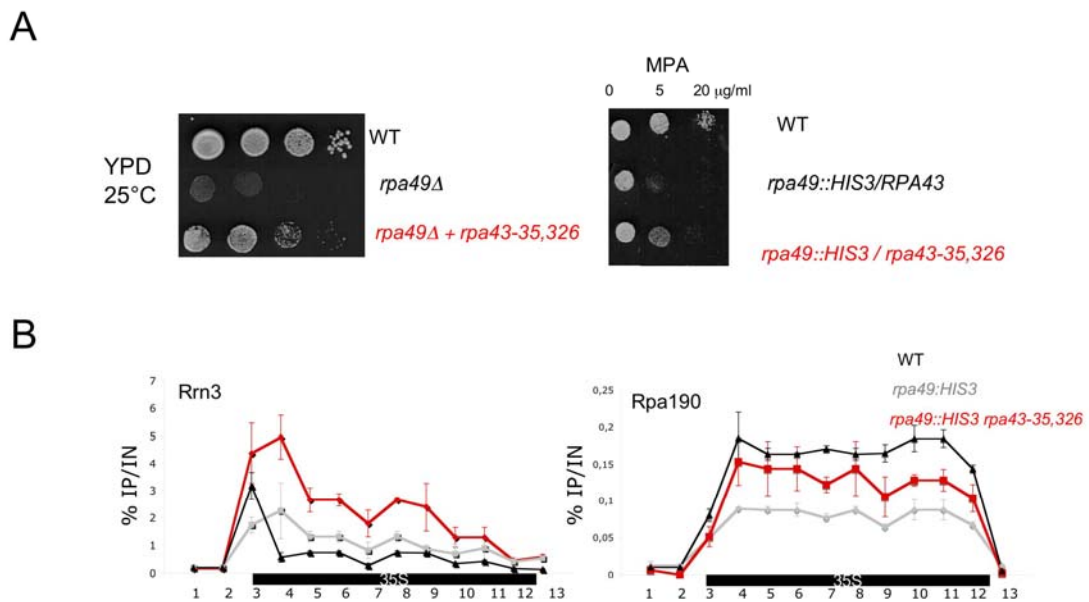


Figure 9. Suppression of *rpa49* mutants by an N-terminal deletion of Rpa43 (*rpa43-35,326*). (A) Strains D710-8A (*rpa43Δ rpa49Δ*) and SL107-3B (*rpa43Δ rpa49::HIS3*) bearing the YCP43-12 (*URA3 RPA43*) plasmid was transformed with plasmid pGEN-RPA43 (*TRP1 RPA43*) and pFB63 (*TRP1 rpa43-35,326*). Transformants were replica plated on FOA medium to chase YCP43-12, and tested on YPD (25°C) and SC medium with mycophenolate (20 μg/ml, 30°C) and incubated three days at 25°C, as described in Figure 3 above. Strain YPH500 was used as a wild-type control. (B) ChIP assays were done on strains SL97-17C (WT) and SL107-3b (*rpa49::HIS3*) bearing plasmids pFB63 (*rpa43-35,326*) or pGEN-RPA43

(*RPA43*⁺), using the same conditions as above, except that cells were cultivated in SD + aa and were harvested at an A₆₀₀ of 0.2.

DISCUSSION

Previous studies have shown that the genetic inactivation of Rpa49 and/or Rpa34 is viable in *S. cerevisiae*, and that these subunits are therefore not strictly essential for transcription (Gadal et al., 1997; Liljelund et al., 1992). However, *rpa49Δ* has severe growth defects (Gadal et al., 2002; Gadal et al., 1997) and was identified in a genome-wide screening for mycophenolate-sensitive mutants (Desmoucelles et al., 2002), a first clue to its importance for transcript elongation. This sensitivity correlates with a defective release of Rrn3 from Pol I and a strong instability of the elongating Pol I in *rpa49* mutants. Moreover, *rpa49* mutants are synthetic lethal with *top1Δ* (lacking a type I DNA topoisomerase) or *hmo1Δ*, inactivated for Hmo1, an HMG box protein residing on rDNA (Gadal et al., 2002; Hall et al., 2006), suggesting that the progression of the mutant Pol I is unusually dependent on the topology (Top1) or spatial organisation (Hmo1) of rDNA. Finally, *rpa49* mutants are unable to overcome the constraint imposed on Pol I by fusing Rrn3 to the Rpa43 subunit (Laferté et al., 2006). Hence, Rpa49 probably plays a key role when Pol I leaves the rDNA promoter to start processive transcription. In addition, Rpa49 may directly co-operate with Rpa43 during the binding of Rrn3 to Pol I or when the resulting Pol I-Rrn3 complex is targeted to the rDNA promoter. This, in particular, would account for the cold-sensitive defect of *rpa49* mutants and its specific suppression by *rpa43-35,326*.

Rpa49 and Rpa34 are non-catalytic components of Pol I, and their loss in highly purified preparations of yeast Pol I does not impair the ability to transcribe non-specific DNA templates (Huet et al., 1975). The corresponding mammalian proteins are also readily separated from the purified Pol I, which first suggested that they were Pol I-associated factors rather than *bona fide* subunits (Hanada et al., 1996). We found here that Rpa34 and Rpa49 specifically interact in a genome-wide two-hybrid interaction screen, and have assigned the main Rpa34-binding domain to positions 63-129 in Rpa49. This is at variance with previous data suggesting that Rpa34 and Rpa49 do not contact each other in the Pol I envelope (Bischler et al., 2002), but recent structural studies also support the idea that Rpa34 and Rpa49 bind each other (Kuhn et al., submitted for publication). This binding is clearly important to recruit Rpa34 onto Pol I, as this subunit is lost from Pol I in *rpa49* mutants lacking the binding domain. Rpa49, on the other hand, may directly bind the Pol I core structure, since *rpa34Δ* only has a minor effect on its association to Pol I.

Taken together, these data argue that Rpa34 and Rpa49 form a functionally specialised dimer in Pol I. The most critical part of this dimer appears to be the Conserved C-end of Rpa49, as already suggested by a previous study in *S. pombe*, showing that the N-end of its Rpa49-like subunit can be largely deleted without impairing growth, but that its C-terminal part is critical *in vivo* (Nakagawa et al., 2003). This is fully supported by our finding that the N-terminal part of Rpa49 ensures its binding to Rpa34, and that the corresponding mutants only have the minor defects of *rpa34Δ* itself. Conversely, relatively short C-terminal deletions or a premature termination mutant (*rpa49::HIS3*) behaved like null-mutants, which may be explained by the inactivation of a conserved domain comprised between positions 326 and 371 in *S. cerevisiae*. At the light of these findings, it would be interesting to investigate in more details the transcriptional properties of the *rpa49::HIS3* mutant Pol I.

In contrast to the severe phenotypes of these *rpa49* mutants, *rpa34Δ* has no growth defects and only leads to synthetic lethal effects shared with *rpa49Δ* and suppressed by over-expressing Rpa49. One may therefore wonder if Rpa34 has a role of its own, or if it merely optimises the biological role of Rpa49. The two-hybrid interaction found here between Rpa34 and three other nucleolar proteins Gno1, Nop56 and Nop58 tentatively suggests that Rpa34 may favour the co-transcriptional recruitment of the pre-rRNA maturation machine to the nascent transcript, since these putative partners intervene in the early maturation of the 35S pre-rRNA (Guglielmi and Werner., 2002; Dragon et al., 2002; Gautier et al., 1997). Intriguingly, these three proteins are also endowed with KKE/D repeats, like Rpa34 itself, although the biological meaning of these domains remains to be established.

As noted above, mammalian cell-free extracts contains two Pol I-associated factors, PAF53 and PAF49, that correspond to single proteins with a strong homology to Rpa49 in the case of PAF53 (Hanada et al., 1996), and a weak but clearly significant homology to Rpa34 in the case of PAF49/CAST (Panov et al., 2006b). *In vitro*, PAF53 and PAF49/CAST stimulate the faithful transcription of rDNA by Pol I and may functionally and/or physically interact with UBF, an HMG box protein associated to animal Pol I (Bell et al., 1988). UBF stands for ‘upstream binding factor’, thus pointing to a role in the pre-initiation steps of rDNA transcription (Bell et al., 1988), but recent evidence suggests instead that UBF contributes to promoter escape (Panov et al., 2006a) or may even modulate the progression of Pol I along its rDNA template, since it actually binds the entire Pol I-transcribed region (O’Sullivan et al., 2002; Stefanovsky et al., 2006). Likewise, *rpa49Δ* is suppressed by the over-expression of Hmo1, which is probably the yeast UBF (Gadal et al., 2002). Hmo1 was recently shown to

bind the whole Pol I transcribed unit and to also be a Pol II factor that binds many members of the ribosomal protein regulon (Hall et al., 2006; Kasahara et al., 2007). *In vitro*, Hmo1 unwinds DNA in the presence of DNA topoisomerase I (Lu et al., 1996), and it is therefore worth noting that *top1Δ* and *hmo1Δ* are both synthetic lethal with *rpa34Δ* and *rpa49Δ*. The functional interplay between Rpa49/Rpa34 and Hmo1 or their mammalian counterparts needs to be investigated more thoroughly, but we would be surprised if it did not reflect a conserved mechanism operating from yeast to man.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, yeast strains and DNA primers (Table T1) are shown as supporting information. Yeast strains were constructed by meiotic crosses, DNA transformation and plasmid shuffle by selection on FOA medium with 0.1 % 5-fluoro-orotate (Boeke et al., 1984). Null alleles with KanMX4 insertions from Euroscarf (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>) were checked by *ad hoc* PCR amplifications. The *rrn3-8* allele, initially called *cycl-8* (Cadwell et al., 1997) did not complement *rrn3Δ::HIS3* in an *rrn3-8/rrn3Δ* diploid and was complemented by a centromeric plasmid bearing the wild type *RRN3* gene. The mutant allele was cloned by plasmid rescue and found to harbour six amino acid replacements (W150R, D153V, I163N, D254N, G355S, R508G) compared to the S288C genome. The *rpa135-D398N* and *rpa135-L656P* alleles were isolated after UV-mutagenesis of the *rpa34::HIS3* strain OG1-1C transformed by plasmid pOG1-A34 (Gadal et al., 1997), and were selected by a method based on the lack of white sectoring in the UV-mutagenised clones (Kranz and Holm, 1990), which signals their inability to lose pOG1-A34, therefore indicating that the *rpa34::HIS3* allele is now essential for growth.

Newly constructed plasmids were prepared from PCR-amplified DNA. In most cases, we used the Gateway[®] cloning system with previously described destination vectors (Van Mullem et al., 2003). All inserts were re-sequenced to detect spurious mutations generated by DNA amplification. Chimeras between the Rpa43 coding sequence of *S. cerevisiae* and *S. pombe* were constructed by overlap extension PCR, using Pfu DNA Polymerase. Primer sequences are available upon request to Y.N.

Chromatin immuno-precipitation (ChIP) was systematically done on three independent cultures of 100 mL harvested at an A₆₀₀ of 0.6, with slight modifications of a previously described experimental protocol (Laferté et al., 2006) and using the rDNA primers listed in Table S4. Yeast cells were cultivated YPD medium, except for experiments involving mycophenolate, where we used synthetic dextrose medium (SD+aa) supplemented with

histidine, arginine, tryptophan and adenine sulphate (20 mg/L each), leucine and lysine (30 mg/L). rDNA copy numbers were estimated by comparing the kinetics of PCR amplification on rDNA primers and on *PYK1* primers used as a single-gene control, giving an average value of 186 +/- 54 copies.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Riva for polyclonal antibodies, M. Fromont-Racine for a two-hybrid yeast library, M. Goussot for technical help in two-hybrid screening, C. Carles, S. Chédin, M. Kwapisz, C. Mann, M. Riva, E. Shematorova, J. Soutourina and M. Wéry for useful suggestions, and P. Cramer for kindly communicating unpublished data (Kuhn et al., submitted for publication). This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (F.B.), by an ATIP grant from CNRS and by the Agence Nationale de la Recherche O.G.

LITTERATURE CITED

- Aprikian, P., Moorefield, B. and Reeder, R.H. (2001) New model for the yeast RNA polymerase I transcription cycle. *Mol Cell Biol*, 21, 4847-4855.
- Armache, K.J., Kettenberger, H. and Cramer, P. (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6964-6968.
- Aslett, M. and Wood, V. (2006) Gene Ontology annotation status of the fission yeast genome: preliminary coverage approaches 100%. *Yeast*, 23, 913-919.
- Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H.M. and Tjian, R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates ribosomal RNA synthesis. *Science*, 241, 1192-1197.
- Bier, M., Fath, S. and Tschochner, H. (2004) The composition of the RNA polymerase I transcription machinery switches from initiation to elongation mode. *FEBS Lett*, 564, 41-46.
- Bischler, N., Brino, L., Carles, C., Riva, M., Tschochner, H., Mallouh, V. and Schultz, P. (2002) Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *EMBO J.*, 21, 4136-4144.
- Bodem, J., Dobрева, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M. and Grummt, I. (2000) TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep*, 1, 171-175.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. and Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast : 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, 197, 345-346.
- Boukhgalter, B., Liu, M., Guo, A., Tripp, M., Tran, K., Huynh, C. and Pape, L. (2002) Characterization of a fission yeast subunit of an RNA polymerase I essential transcription initiation factor, SpRrn7h/TAF(I)68, that bridges yeast and mammals: association with SpRrn11h and the core ribosomal RNA gene promoter. *Gene*, 291, 187-201.

- Cadwell, C., Yoon, H.Y., Zebajarian, Y. and Carbon, J. (1997) The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts genetically with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 6175-6183.
- Carles, C., Treich, I., Bouet, F., Riva, M. and Sentenac, A. (1991) Two additional common subunits, ABC10a and ABC10b, are shared by yeast RNA polymerases. *J. Biol. Chem.*, 266, 24092-24096.
- Comai, L., Tanese, N. and Tjian, R. (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor SL1. *Cell*, 68, 965-976.
- Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C. and Daignan-Fornier, B. (2002) Screening the yeast 'disruptome' for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 27036-27044.
- Dragon, F., J. E. Gallagher, P. A. Compagnone-Post, B. M. Mitchell, K. A. Porwancher, K. A. Wehner, S. Wormsley, R. E. Settlege, J. Shabanowitz, Y. Osheim, A. L. Beyer, D. F. Hunt, and S. J. Baserga. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417:967-70.
- Exinger, F. and Lacroute, F. (1992) 6-azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 22, 9-11.
- Fernandez-Tornero, C., Bottcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W., Sentenac, A., Muller, C.W. and Schoehn, G. (2007) Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol Cell*, 25, 813-823.
- Flores, A., Briand, J.F., Boschiero, C., Gadal, O., Andrau, J.C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A. and Werner, M. (1999) A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96, 7815-7820.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C. and Thuriaux, P. (2002) Hmo1, an HMG-Box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.*, 21, 5498-5507.
- Gadal, O., Mariotte-Labarre, S., Chédin, S., Quémeneur, E., Carles, C., Sentenac, A. and Thuriaux, P. (1997) A34.5, a non-essential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machinery. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 1787-1795.
- Gautier, T., T. Berges, D. Tollervey, and E. Hurt. 1997. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 17:7088-98.
- Gorski, J.J., Pathak, S., Panov, K., Kasciukovic, T., Panova, T., Russell, J. and Zomerdijs, J.C. (2007) A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *Embo J*, 26, 1560-1568.
- Grummt, I. (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev*, 17, 1691-1702.
- Guglielmi, B. and Werner, M. (2002) The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and snoRNA maturation, not in telomere elongation inhibition. *J Biol Chem*, 277, 35712-35719.

- Hall, D.B., Wade, J.T. and Struhl, K. (2006) An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 26, 3672-3679.
- Hanada, K.I., Song, C.Z., Yamamoto, K., Yano, K.I., Maeda, Y., Yamagushi, K. and Muramatsu, M. (1996) RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J.*, 15, 2217-2226.
- Hernandez, N. (1993) TBP, a universal eukaryotic transcription factor ? *Genes Dev.*, 7, 1291-1308.
- Huet, J., Buhler, J.M., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1975) Dissociation of two polypeptide chains from yeast RNA polymerase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 72, 3034-3038.
- Imazawa, Y., Hisatake, K., Mitsuzawa, H., Matsumoto, M., Tsukui, T., Nakagawa, K., Nakadai, T., Shimada, M., Ishihama, A. and Nogi, Y. (2005) The fission yeast protein Ker1p is an ortholog of RNA polymerase I subunit A14 in *Saccharomyces cerevisiae* and is required for stable association of Rrn3p and RPA21 in RNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 11467-11474.
- Jasiak, A.J., Armache, K.J., Martens, B., Jansen, R.P. and Cramer, P. (2006) Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell*, 23, 71-81.
- Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K. and Kokubo, T. (2007) Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*.
- Keys, D.A., Lee, B.S., Dodd, J.A., Nguyen, T.T., Vu, L., Fantino, E., Burson, L.M., Nogi, Y. and Nomura, M. (1996) Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes and Development*, 10, 887-903.
- Keys, D.A., Vu, L., Steffan, J.S., Dodd, J.A., Yamamoto, R., Nogi, Y. and Nomura, M. (1994) RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*, 8, 2349-2362.
- Kranz, J.E. and Holm, C. (1990) Cloning by function : an alternative approach for identifying yeast homologs of genes from other organisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 6629-6633.
- Laferté, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C. and Chédin, S. (2006) The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev*, 20, 2030-2040.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. and Zillig, W. (1995) Transcription in Archaea: similarity to that in Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5768-5772.
- Liljelund, P., Mariotte, M., Buhler, J.M. and Sentenac, A. (1992) Characterization and mutagenesis of the gene encoding the A49 subunit of RNA polymerase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89, 9302-9305.
- Marck, C. (1988) "DNA strider" : a C program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucl. Acids Res.*, 16, 1829-1836.
- Milkereit, P. and Tschochner, H. (1998) A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *EMBO Journal*, 17, 3692-3703.

- Miller, G., Panov, K.I., Friedrich, J.K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I. and Zomerdijk, J.C. (2001) hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *EMBO Journal*, 20, 1373-1382.
- Moorefield, B., Greene, E.A. and Reeder, R.H. (2000) RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4724-4729.
- Nakagawa, K., Hisatake, K., Imazawa, Y., Ishiguro, A., Matsumoto, M., Pape, L., Ishihama, A. and Nogi, Y. (2003) The fission yeast RPA51 is a functional homolog of the budding yeast A49 subunit of RNA polymerase I and required for maximizing transcription of ribosomal DNA. *Genes Genet Syst*, 78, 199-209.
- Nogi, Y., Vu, L. and Nomura, M. (1991) An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 7026-7030.
- Nomura, M. (1999) Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and common principles. *Journal of Bacteriology*, 181, 6857-6864.
- O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J. and McStay, B. (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol*, 22, 657-668.
- Panov, K.I., Friedrich, J.K., Russell, J. and Zomerdijk, J.C. (2006a) UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *Embo J*, 25, 3310-3322.
- Panov, K.I., Panova, T.B., Gadai, O., Nishiyama, K., Saito, T., Russell, J. and Zomerdijk, J.C. (2006b) RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol Cell Biol*, 26, 5436-5448.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. and Riva, M. (2000) The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *EMBO Journal*, 19, 5473-5482.
- Riva, M., Mémet, S., Micouin, J.Y., Huet, J., Treich, I., Dassa, J., Young, R., Buhler, J.M., Sentenac, A. and Fromageot, P. (1986) Isolation of structural genes for yeast RNA polymerases by immunological screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83, 1554-1558.
- Rudra, D. and Warner, J.R. (2004) What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev*, 18, 2431-2436.
- Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L. and Nomura, M. (2007) Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell*, 26, 217-229.
- Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. and Moss, T. (2006) Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell*, 21, 629-639.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D.P., Crane-Robinson, C. and Moss, T. (2001) DNA looping in the RNA polymerase I enhancosome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res*, 29, 3241-3247.
- Thuriaux, P., Mariotte, S., Buhler, J.M., Sentenac, A., Vu, L., Lee, B.S. and Nomura, M. (1995) Gene RPA43 in *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential subunit of RNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 24252-24257.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M. and Boone, C. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, 294, 2364-2368.

- Van Mullem, V., Landrieux, E., Vandenhaute, J. and Thuriaux, P. (2002) Rpa12p, a conserved RNA polymerase I subunit with two functional domains. *Molecular Microbiology*, 43, 1105-1113.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. and Vandenhaute, J. (2003) Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast*, 20, 739-746.
- Walgraffe, D., Devaux, S., Lecordier, L., Dierick, J.F., Dieu, M., Van den Abbeele, J., Pays, E. and Vanhamme, L. (2005) Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 139, 249-260.
- Werner, F. and Weinzierl, R.O. (2002) A Recombinant RNA Polymerase II-like Enzyme Capable of Promoter- Specific Transcription. *Mol Cell*, 10, 635-646.
- Yamamoto, K., Yamamoto, M., Hanada, K., Nogi, Y., Matsuyama, T. and Muramatsu, M. (2004) Multiple protein-protein interactions by RNA polymerase I-associated factor PAF49 and role of PAF49 in rRNA transcription. *Mol Cell Biol*, 24, 6338-6349.
- Yamamoto, R.T., Nogi, Y., Dodd, J.A. and Nomura, M. (1996) RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *EMBO Journal*, 15, 3964-3973.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K. and Darst, S.A. (1999) Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution [see comments]. *Cell*, 98, 811-824.
- Zomerdijk, J.C.B.M., Beckmann, H., Comai, L. and Tjian, R. (1994) Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science*, 266, 2015-2018.

Table 1. List of the primers used in ChIP assays.

	Sequence	
rDNA1	1F TCGCGTATGGTCACCCACTAC 1R GTTGCGGCCATATCTACCAGA	-1345, -1245 (relatively to 5' end of the 35S pre-rDNA)
rDNA2	2F CCGTTATTGGTAGGAGTGTGGTG 2R ACGGAAATACGCTTCAGAGACC	-559, -456
rDNA3	3F GTGTGAGGAAAAGTAGTTGGGAGGTA 3R GACGAGGCCATTTACAAAAACATAAC	-30, +93
rDNA4	4F CTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC 4R ACCACAGTTATACCATGTAGTAAAGGAACT	+731, +855
rDNA5	5F GCGAACCAGGACTTTTACTTTGA 5R AACAAAATAGAACCAAACGTCCTATTC	+1430, +1536
rDNA6	GGTCTGTGATGCCCTTAGACG AGTTTCACAAGATTACCAAGACCTCTC	+2128, +228
rDNA7	AATATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCT CGATGATTCACGGAATTCTGC	+2854, +2956
rDNA8	GGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATT CACGTACTTTTTTACTCTCTTTTCAA	+3551, +3657
rDNA9	TATGAGGTAAAGCGAATGATTAGAGG CACGTTCAATTAAGTAACAAGGACTTCT	+4239, +5015
rDNA10	GGAGGAGTTATCTTTTCTTCTTAACAGCT AAGGTGCTGGCCTCTTCCA	+4925, +5015
rDNA11	AAAGAAGACCCTGTTGAGCTTGA GTATTTCACTGGCGCCGAA	+5648, +5740
rDNA12	ATCATTTGTATACGACTTAGATGTACAACG AACAAATCAGACAACAAAGGCTTAATC	+6547, +6648
rDNA13	CTCATTTTCTATAGTTAACAGGACATGC TTCACTTGTCTCTTACATCTTTCTTGG	+6947, +7048
PYK1	PYK1P1 CGCACCGTCACAAAGTGTT PYK1P2 TGGGAAGGAAAGGAAATCAC	-444, -285 (relatively to the <i>PYK1</i> ATG)

Table 2. Yeast strains.

STRAINS	GENOTYPE	ORIGIN
49::HIS3	<i>MATα rpa49::HIS3 ura3-52 his3Δ200 trp1Δ1 lys2-801 ade2-1</i>	(1)
49 Δ A	<i>MATα rpa49Δ::TRP1 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ1 lys2-801 ade2-1</i>	(1)
A14::URA3	<i>MATα ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 rpa14Δ::URA3 his3Δ200 leu2Δ1</i>	(2)
D101-H3	<i>MATα rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 (3)
D123-12B	<i>MATα ura3 trp1 his3-11 lys2-801 leu2-3,112 ade2-1 rpa49Δ::TRP1</i>	(4)
D360-1A	<i>MATα ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rpa14Δ::HIS3</i>	(4)
D574-1B	<i>MATα ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 ade2-1 rpa49Δ::TRP1 RRN9::HA-KanMX4</i>	RRN9-HA, D123-12B
D612-5A	<i>MATα leu2Δ1 his3Δ200 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1 rpa49::HIS3 RRN3::3HA::TRP1(Sp)</i>	YMR9, 49::HIS3
D683-5A	<i>MATα ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 top1Δ::LEU2 rpa49Δ::KanMX4 // PFB74 (2μ URA3 RPA49)</i>	Y01196, W500-1D
D684-2B	<i>MATα ade2 ura3 lys2 trp1 his3 leu2 hmo1Δ::HIS3 rpa49Δ::KanMX4 // PFB74 (2μ URA3 RPA49)</i>	Y01196, SL16-2C
D699-13C	<i>MATα ade2 ura3 lys2 trp1 his3 leu2 rpa14Δ::HIS3 rpa49Δ::KanMX4 // PFB74 (2μ URA3 RPA49)</i>	Y01196, D360-1A
D704-6C	<i>MATα ura3 ade2-1 his3 trp1Δ63 rpa49Δ::kanMX4</i>	Y01196, YPH499
D710-8A	<i>MATα rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 rpa49Δ::KanMX4 // YCPA43 CEN URA3 RPA43)</i>	D101-H3, Y01196
D716-9A	<i>MATα trp1 leu2 ura3 rrn3-8 rpa49Δ::KanMX4 // PFB74 (2μ URA3 RPA49)</i>	Y01196, D567-11B
D769-2C	<i>MATα ura3 his3-Δ200 trp1 lys2 ade2 leu2 rpa135-L656P::LYS2 RRN3::HA::KanMX4</i>	OG1-L656,
OG1-1C	<i>MATα ura3 trp1 his3 lys2-801 ade2Δ ade3Δ leu2-3,112 rpa34Δ::HIS3</i>	(4)
OG1-D395	<i>MATα ura3 trp1 his3 lys2-801 ade2Δ ade3Δ leu2-3,112 rpa135-D395N rpa34Δ::HIS3 // pOG1-A34</i>	OG1-C, UV mutagenesis
OG1-L656	<i>MATα ura3 trp1 his3 lys2-801 ade2Δ ade3Δ leu2-3,112 rpa34Δ::HIS3 rpa135-L656P // pOG1-A334</i>	OG1-1C, UV mutagenesis
OG17-1C	<i>MATα ura3 trp1 his3 lys2-801 ade2Δ ade3Δ leu2-3,112 rpa34Δ::HIS3 top1Δ::LEU2 // pOG1-A34</i>	T4-1C, YPH499
OG36-1A	<i>MATα ura3 his3Δ200 trp1 lys2 ade2 leu2-3,112 rpa135-L656P::LYS2</i>	OG1-L656, YPH499
SL102-3C	<i>MATα ura3-52 ade2-1 lys-801 his3-Δ200 trp1 rpa49Δ::kanMX4 rpa34-Δ::HIS3</i>	D101, T4-1C
SL105-7A	<i>MATα ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn7::HA3::KanMX4 rpa43Δ::LEU2 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2 , RRN7-HA
SL106-7A	<i>MATα ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3-Δ200 leu2Δ1 RRN9::HA-KanMX4 rpa43Δ::LEU2 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2, RRN9-HA
SL107-3B	<i>MATα rpa49::HIS3 rpa43Δ::LEU2 ura3-52 his3Δ200 trp1 lys2-801 ade2 leu2-Δ1 RRN3::HA::kanMX4 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	YMR9, D101-H3
SL111-4A	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 trp1 lys2-801 ade2-1 leu2Δ1 rrn7::HA3::KanMX4 rpa49Δ::TRP1</i>	RRN7-HA, 49- Δ W
SL112-1C	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 trp1 lys2-801 ade2-1 rrn3::HA::KanMX4 rpa49Δ::TRP1</i>	SL97-17C , 49- Δ W
SL16-2C	<i>MATα ade2 ura3-52 lys2-801 his3-Δ200 leu2-Δ1 hmo1Δ::HIS3</i>	(11)
SL46-1D	<i>MATα ura3 his3 trp1 lys2 ade2 leu2 rpa135-D395N::LYS2</i>	OG1-D395, YPH499

SL89	<i>MATα ura3-52 ade2-1 lys-801 leu2-Δ1 his3-Δ200 trp1Δ63 rpa49Δ::HA::kanMX4</i>	YPH499
SL9-2C	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 lys2-801 ade2-1 leu2-Δ1 rpa12-Δ::LEU2</i>	(4)
SL97-17C	<i>MATα rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RRN3::HA::KanMX4 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 , RRN3-HA
T4-1C	<i>MATα rpa34Δ::HIS3 ura3-52 ade2-1 lys2-801 his3Δ200 trp1Δ1</i>	(4)
W500-1D	<i>MATα ade2-1 can1-100 ura3-1 lys2-801 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 top1Δ::LEU2</i>	W303-1A
Y01196	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpa49Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
YBF51	<i>MATα ura3 trp1 his3-11 lys2-801 leu2-3,112 ade2-1 rpa49Δ::TRP1 RPA190::3HA::HIS3</i>	YPH499
YCC95	<i>MATα ura3-52 ade5 his7-2 trp1-289 leu2-112 rrn3-8</i>	(6)
YMR9	<i>MATα ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RRN3::HA3::TRP1(Sp)</i>	YPH499
YPH499	<i>MATα ura3-52 ade2-1 lys2-801 his3Δ200 trp1Δ63 leu2Δ</i>	(7)

Table 3. Plasmids constructed in this study. All of them have a 2 μ origin of replication

Plasmid	Yeast gene	Backbone vector
PGBT9-RPA34	<i>LEU2 GAL4BD(1-147)::RPA34</i>	pVV212*
pFB492	<i>TRP1 GAL4AD(768-881)::RPA49</i>	pVV213**
pFB493	<i>TRP1 GAL4AD(768-881)::rpa49-63,416</i>	pVV213
pFB494	<i>TRP1 GAL4AD(768-881)::rpa49-89,416</i>	pVV213
pFB495	<i>TRP1 GAL4AD(768-881)::rpa49-119,416</i>	pVV213
pFB496	<i>TRP1 GAL4AD(768-881)::rpa49-1,260</i>	pVV213
pFB497	<i>TRP1 GAL4AD(768-881)::rpa49-1,366</i>	pVV213
pFB62	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,265</i>	pVV200
pFB63	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,326</i>	pVV200
pFB74	<i>URA3 pPGK::RPA49</i>	pVV214 (8)
pGA43-chim2	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim2</i>	pGEN
pGEN-RPA43	<i>TRP1 pPGK::RPA43</i>	pGEN
pSLA34	<i>URA3 RPA34</i>	pFL44L (9)
pVV200-a49	<i>TRP1 pPGK::RPA49</i>	pVV200
pVV200-a49 Δ N119	<i>TRP1 pPGK::rpa49-119,416</i>	pVV200
pVV200-a49 Δ C156	<i>TRP1 pPGK::rpa49-1,260</i>	pVV200
pVV200-a49 Δ C45	<i>TRP1 pPGK::rpa49-1,366</i>	pVV200
pVV200-a49 Δ N63	<i>TRP1 pPGK::rpa49-63,416</i>	pVV200
pVV200-a49 Δ N89	<i>TRP1 pPGK::rpa49-89,416</i>	pVV200
pGEN-A49	<i>TRP1 pPGK::RPA49</i>	pGEN

* Gateway® versions of pGBT9, V. Van Mullem & M. Wéry, personnel communication.

** Gateway® versions of pACT2, V. Van Mullem & M. Wéry, personnel communication.

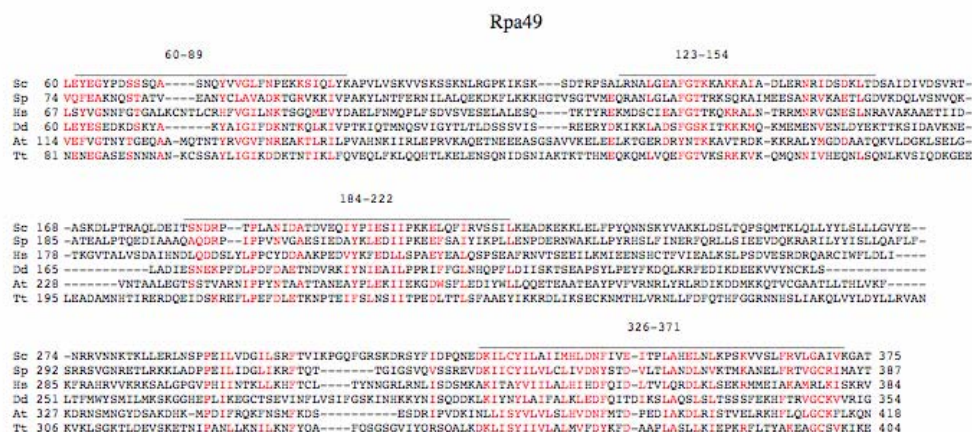
1. Liljelund, P., Mariotte, M., Buhler, J. M. & Sentenac, A. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9302-9305.
2. Smid, A., Riva, M., Bouet, F., Sentenac, A. & Carles, C. (1995) *J Biol Chem* 270, 1354-13540.
3. Thuriaux, P., Mariotte, S., Buhler, J. M., Sentenac, A., Vu, L., Lee, B. S. & Nomura, M. (1995) *J Biol Chem* 270, 24252-24257.
4. Gadal, O., Chédin, S., Quémeneur, E., Carles, C., Sentenac, A. & Thuriaux, P. (1997) *Mol Cell Biol* 17, 1787-1795.
6. Cadwell, C., Yoon, H. Y., Zebartjadian, Y. & Carbon, J. (1997) *Mol Cell Biol* 17, 6175-6183.

7. Shpakovski, G. V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J. F., Thuriaux, P. & Vigneron, M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 4702-4710.
8. Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhaute, J. (2003) *Yeast* 20, 739-46.
9. Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. & Lacroute, F. (1991) *Yeast* 7, 609-615.
10. Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C. and Thuriaux, P. (2002) *EMBO J.*, 21, 5498-5507.

Figure S1. Conservation of the Rpa49 and Rpa34 amino acid sequences. Homology searches were based on the PSI-BLAST method and applied to all eukaryotic sequences currently available at the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), The following conservation groups were used: ILMV, EQ, AGS, ST, FHWY, DN, KR, DE, and NQ. They were only scored when present in a majority of the aligned sequences.

Rpa49 : Sequence alignments for *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *H. sapiens*, *Dictyostelium discoideum*, *Arabidopsis thaliana* and *Tetrahymena piriformis*. Four conserved domains are denoted by horizontal lines.

Rpa34 : Sequence alignments for *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *H. sapiens* and *Dictyostelium discoideum*. The red and blue lines denote two conserved domains, with a conserved Tyrosine underscored by a star. Note the highly charged C-end, and its considerable development in the human protein.



Les partenaires fonctionnels de Rpa43 dans la transcription par l'ARN polymérase I

Rpa43 est une protéine conservée chez les eucaryotes, qui est strictement essentielle à la viabilité cellulaire et à la synthèse de l'ARNr *in vivo* (Thuriaux et al. 1995). On a d'abord pensé que, comme les sous-unités Rpa49 et Rpa34, elle était strictement spécifique de l'ARN polymérase I. Cependant, Shpakovski et Shematorova (1999) ont noté sa ressemblance de séquence avec la sous-unité Rpb7 de l'ARN polymérase II, elle-même proche de Rpc25 (RNA polymérase III) et RpoE (Archées).

Une première caractérisation fonctionnelle de Rpa43 a été réalisée par Gérard Peyroche durant sa thèse dans l'équipe de Christophe Carle et Michel Riva (Peyroche et al. 2000). Ce travail a montré que Rpa43 lie le facteur de transcription Rrn3 et assure ainsi le recrutement de l'ARN polymérase I sur la région promotrice de l'ADNr (2). Rpa43 interagit avec la sous-unité Rpa14 et forme avec celle-ci une structure spécialisée, le *stalk* (la tige). Rpa14 est une sous-unité non-essentielle, dont l'inactivation conduit à un faible défaut de croissance à 37°C (Smid et al. 1995). L'ARN polymérase I purifiée à partir d'une souche *rpa14Δ* est inactive *in vitro*, quand on la dose sur une matrice d'ADN non-spécifique, mais cela s'accompagne d'une dissociation spontanée de Rpa43 et de la sous-unité commune Rpb6 lors de la purification (Lanzendorfer et al. 1997).

Le travail qui suit présente une caractérisation fonctionnelle de différents mutants de Rpa43, qui a été le point de départ de l'étude des sous-unités Rpa49 et Rpa34 présentée au chapitre précédent. Les mutants étudiés et les interactions de létalité synthétiques ont été réalisés par Sylvie Labarre et moi-même, et j'ai assuré l'ensemble des expériences de Chlp et d'interaction double-hybride présentées. Certains de ces mutants sont des chimères entre la sous unité Rpa43 de *S. pombe* et celle de *S. cerevisiae*, construites par Yukiko Imazawa et Yasuhisa Nogi (Saitama Medical School, Japon). Enfin l'identification de Spt5 et Spt6 comme partenaires double-hybride de Rpa43 est due à Gérard Peyroche (thèse 2002). Ce texte a été rédigé en anglais pour servir de base à un article futur, mais ne représente pas une version définitive de cet article.

Frédéric BECKOUËT ¹
Sylvie LABARRE-MARIOTTE ¹
Gérald PEYROCHE ¹
Yukiko IMAZAWA ²
Yasuhisa NOGI ²
Pierre THURIAUX ^{1*}

Rpa43 and its functional partners in rDNA transcription

(1) Service de Biologie Intégrative & Génétique Moléculaire, CEA/Saclay. Bâtiment
144.
F-91191 Gif/Yvette. FRANCE.

(2) Saitama Medical School, Department of Molecular Biology. 38 Morohongo,
Moroyama. Iruma-Gun, Saitama 350-04. JAPAN.

* Corresponding author

Tel: +33 1 69 08 35 86
Fax: +33 1 69 08 47 12
E-mail: pierre.thuriaux@cea.fr

SUMMARY

Rpa43 is an RNA polymerase I subunit that belongs to a conserved family of eukaryotic and archaeal polypeptides also including Rpb7 (RNA polymerase II), Rpc25 (RNA polymerase III) and the archaeal RNA polymerase subunit RpoE. The conserved region of Rpa43 is divided in two parts, formed of an Rpb7-like domain and of an RNA polymerase I-specific domain, respectively. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and in most eukaryotic lineages, Rpa43 is essentially limited to these two domains. The *S. pombe* subunit cannot replace its *S. cerevisiae* counterpart in vivo, but chimeric constructions indicate that this is primarily due to a short insert of thirteen amino acids present in the conserved Rpb7-like domain of Rpa43 in *S. cerevisiae* and in other hemiascomycetous yeasts. The Rpa43 subunits of *S. cerevisiae* and of mammals also have large but poorly conserved C-terminal extensions. Conditional or lethal *rpa43* mutants are restricted to the conserved region, whilst a complete deletion of the non-conserved C-terminal domain (*rpa43-1,235*) has no growth defect in its own right. However, this mutant and conditional mutants altered in the conserved part become lethal in the absence of the non-essential RNA polymerase I subunits Rpa34, Rpa49 or Rpa12. The general transcription factors Spt5 and Spt6, recently reported to intervene in RDNA transcription (36) may also be partners of Rpa43 since they interact with Rpa43 in two-hybrid assays, and since the *rpa43-chim2* mutant aggravates the growth phenotype of an *spt6-14* mutant.

INTRODUCTION

RNA polymerase I is one of the three nuclear RNA polymerases of eukaryotes. This enzyme ensures the synthesis of a single pre-ribosomal RNA transcript, which is ultimately processed and post-transcriptionally modified to produce the 18S, 5.8S and 25S ribosomal RNAs (rRNAs). This is the only essential role of RNA polymerase I in yeast *Saccharomyces cerevisiae* (28) and mobilises some 70% of the total transcriptional capacity of yeast cells (29, 35). Yeast RNA polymerase I is made of fourteen protein subunits (16, 18). Twelve of them are related to the ten-subunit core structure of RNA polymerase II (1) and III (12, 20) and are encoded by all eukaryotic genomes investigated so far (33). Rpa43 and Rpa14 form an heterodimer that occupies the 'stalk' domain of RNA polymerase I (2) and belong to a conserved family of eukaryotic and archeal polypeptides that includes Rpb7/Rpb4 (RNA polymerase II), Rpc25/Rpc17 (RNA polymerase III) and the RpoE/RpoF subunits of archaeal RNA polymerases (26, 30, 39, 40). They are not needed for the catalytic activity of the yeast RNA polymerase but Rpa43 is required for faithful transcription of promoter-containing DNA templates, due to its specific interaction with the highly conserved initiation factor Rrn3/TIF-1A (31). The resulting Rrn3-RNA polymerase I complex is then directed to the promoter region where it binds the heterotrimeric Core factor (Rrn6, Rrn7, Rrn10) and Upstream Activating Factor which form a pre-initiation complex (22, 31). Once recruited, Rrn3 is released from the elongating RNA polymerase, and we have recently shown that a heterodimer formed of Rpa49/Rpa34, two subunits specific of RNA polymerase I, stimulates this release in *S. cerevisiae* (Beckouët *et al.*, submitted for publication).

The Rpa43 subunit of *S. cerevisiae* and *H. sapiens* is a fairly large protein of 326 and 338 amino acids, respectively, with a conserved central region formed of an Rpb7-like domain and of an RNA polymerase I-specific domain. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, however, Rpa43 is a much shorter protein of 173 amino acids, that is essentially limited to the two conserved domains and cannot replace its *S. cerevisiae* counterpart *in vivo* (27, 39). We show here that the conserved central domain of Rpa43 is the only critical part of that subunit *in vivo*, and that the lack of heterospecific complementation with *S. pombe* correlates with the presence of a short thirteen amino acid insert typical of *S. cerevisiae* and other hemiascomycetes. The integrity of the central domain is critical for its ability to bind Rpa14 in a two-hybrid assay, but we found that this domain also enables Rpa43 to interact Spt5 and Spt6, two elongation factors that were initially identified as RNA polymerase II partners (17, 43) but have also been suggested to co-operate with RNA polymerase I (36).

MATERIALS AND METHODS

Plasmids, yeast strains and DNA primers are provided as Supporting Information. Mutants were constructed by standard techniques based on meiotic crosses, DNA transformation and plasmid shuffle (46). Plasmids were prepared from PCR-amplified DNA cloned in appropriate vectors by DNA ligation or in vitro recombination. In most constructions, we used the Gateway® technique, with pDONR201 (Invitrogen) as entry vector and pVV200, pVV212 or pVV213 as destination vectors (45). All inserts were re-sequenced to detect spurious mutations generated by DNA amplification. Chimeras between the Rpa43 coding sequence of *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* were constructed by overlap extension PCR, using Pfu DNA Polymerase. Primer sequences are available upon request to Y.N.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was done on three independent cultures (100 mL of Ypraf) harvested at an A600 of 0.6, with slight modifications of a previously described experimental protocol (22). rDNA copy numbers were estimated by comparing the kinetics of PCR amplification on rDNA primers and on PYK1 primers used as a single-gene control (Supporting Information S1). The average value was of 186 +/- 54 copies. Values obtained for isogenic pairs of mutant versus wild-type were in close agreement.

Fluorescence microscopy was done on exponentially grown cells washed in water and stained with Hoechst 33352 (5 ng/μl) for 5 min. Samples were examined using a Leica DMRXA fluorescence microscope. Fluorescent signals were collected with single band pass filters for excitation of YFP (XF104, Omega Optical) and CFP (XF114-2, Omega optical). Images were acquired with a Hamamatsu C4742-95 cooled CCD camera controlled by the Openlab® software (version 2.2.4, Improvision) and processed using Adobe Photoshop® software (version 5, Adobe).

RESULTS

Conservation of Rpa43

All members of the Rpa43/Rpb7/Rpc25 protein family contain a conserved domain of about 90 amino acids (positions 45-138 in the Rpa43 of *S. cerevisiae*) with some thirteen positions that are almost invariant conserved in all eukaryotic and archaeal genomes investigated so far (see Zaros & Thuriaux, 2005 and the alignments provided as supplementary material). In the spatial structure of RNA polymerase II (1, 6), these amino acids belong to the inner part of the ‘stalk’ fold, close to the Rpb6 subunit common to RNA polymerase I, II and III, and to the docking site of TFIIB on Rpb1 (Figure 1 C). This Rpb7/Rpc25-like domain immediately precedes a domain of similar size (positions 139-248) specific of RNA polymerase I (Rpa43), II (Rpb7) or III (Rpc25). In the case of Rpa43, this second part of the conserved region might conceivably form the Rrn3-binding site.

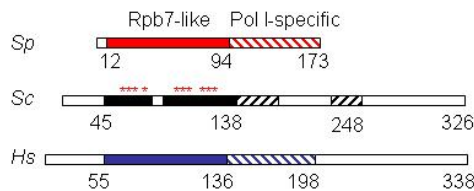
Taking advantage of the latter domain, we looked for Rpa43-like gene products in current genomic databanks, and found them in all eukaryotic lineages analysed so far, to the striking exception of kinetoplastids (Figure 1A). Moreover, a parallel conservation was observed for the Rrn3 initiation factor, which is the direct partner of Rpa43. Their absence in kinetoplastids is consistent with the many other atypical properties of RNA polymerase I in these organisms (10). In sharp contrast to the strong conservation of Rpa43, Rpa14 is poorly conserved and Rpa14-like sequences were only detected in ascomycetous fungi (see Supporting Information).

In most eukaryotes, Rpa43 is essentially limited to its two conserved domains, as illustrated below (Figure 1B) for *S. pombe*. In mammals and in most fungi, however, this central domain is flanked by a short non-conserved N-end and by a large and hydrophilic C-tail, as illustrated in Figure 1B for *S. cerevisiae* and *H. sapiens*, which almost double the size of Rpa43 in these organisms. In addition, *S. cerevisiae* and the other hemiascomycetous yeasts contain a short insert of thirteen amino acids not found in any other eukaryotic lineage.

A

Lineage	Species	RNA polymerase I					Rrn3
		Core	Rpa43	Rpa14	Rpa49	Rpa34	
Fungi	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+
Amoebozoa	<i>D. discoideum</i>	+	+		+	+	+
Animals	<i>H. sapiens</i>	+	+			+	+
Angiosperms	<i>A. thaliana</i>	+	+		+		+
Ciliates	<i>T. thermophila</i>	+	+		+		+
Oomycetes	<i>P. ramorum</i>	+	+		+		+
Diplomonads	<i>G. lamblia</i>	+	+		+		+
Apicomplexans	<i>T. parva</i>	+	+				+
Kinetoplastids	<i>T. cruzi</i>	+					+

B



C

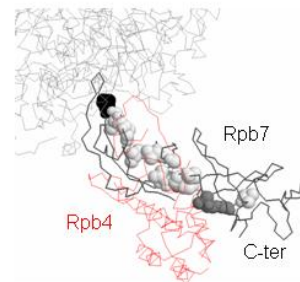


Figure 1. Conservation of Pol I subunits.

A. Table summarising the conservation of the ten core subunits and of Rpa43, Rpa14, Rpa49, Rpa34 and Rrn3 in representative organisms corresponding to all main eukaryotic lineages. The species shown are *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Tetrahymena thermophila*, *Phytophthora ramorum*, *Giardia lamblia*, *Theileria parva* and *Trypanosoma cruzi*.

B. Modular organization of Rpa43 (*S. cerevisiae*, *S. pombe* and *H. sapiens*). Filled, striped and empty boxes represent the Rpb7-like, RNA polymerase I-specific and non-conserved domains, respectively.

C. Spatial organization of the stalk structure in RNA polymerase II.

Heterospecific complementation by the Rpa43 subunit of *S. pombe*

Previous studies have shown that RNA polymerase I contains an equivalent subset of fourteen subunits in *S. cerevisiae* and *S. pombe* and that nine of them (Rpa49, Rpa40, Rpa19, Rpb6, Rpb5, Rpb8, Rpa12, Rpb10 and Rpb12) are functionally interchangeable between these two distantly related fungal species (27, 38). The *rpa43Δ* mutant of *S. cerevisiae*, however, is not rescued by the *S. pombe* subunit (39). We therefore constructed four mutant alleles of the *S. cerevisiae* subunit, based on domain swapping with *S. pombe* (Figure 2). This yielded two viable hybrids, *rpa43-chim1* and *rpa43-chim2*, containing the entire *S. pombe* chain except for its first 59 amino acids (Figure 2A). *rpa43-chim1* behaves like a wild type allele, whilst

rpa43-chim2 forms a temperature-sensitive (ts) mutant. Complementation (*rpa43-chim1*, *rpa43-chim2*) and non-complementing (*rpa43-chim4*, *rpa43-chim7*) hybrids differed by a region comprised between positions 83 and 103 in *S. cerevisiae* (39-59 in *S. pombe*). This region contains the ₉₃DPLSKEDTSEK₁₀₃ motif mentioned above as being only found in *S. cerevisiae* and related yeasts (sequence alignments are provided as Supporting Information), and might thus account for the non-complementation of the *S. pombe* subunit.

S. pombe also lacks the non-conserved N-terminal and C-terminal extensions of *S. cerevisiae*, but these extensions can be deleted (*rpa43-35,326*, *rpa43-35,281*, *rpa43-1,265*) with no detectable growth defect (Figure 2A). A wild-type like growth is also seen for the *rpa43-1,235* deletion, completely removing the entire C-terminal extension and part of the RNA polymerase I-specific conserved domain (Figure 2B). In contrast *rpa43-1,216* removing 32 amino acid of this enzyme-specific domain is lethal, like the equivalent mutant *rpa43-1*, introducing a stop codon (44). Moreover, the data of Figure 2C show that viable mutants altering the conserved region of Rpa43 (*rpa43-chim1*, *rpa43-chim2*, *rpa43-1,235*) disrupt a previously reported two-hybrid binding of Rpa14 to Rpa43 (30), confirming the critical role of the conserved central domain.

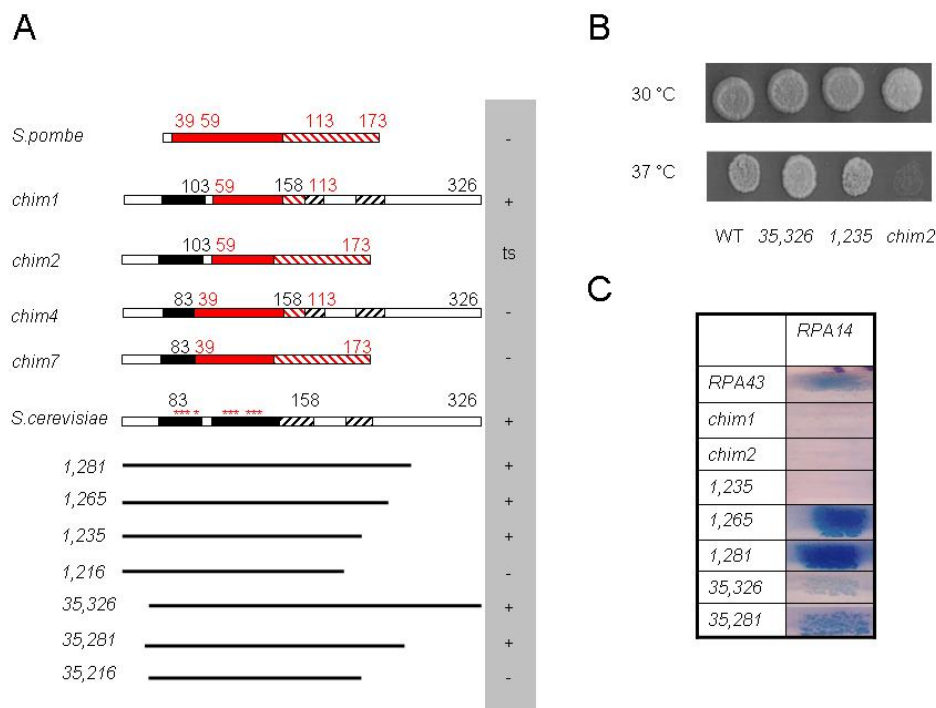


Figure 2. Properties of *rpa43* mutants.

A. Mutagenesis of Rpa43. Numbers denote amino-acid positions and correspond to the limits of the domains swapped between *S. cerevisiae* and *S. pombe* in *rpa43-chim1*, *rpa43-chim2*, *rpa43-chim4* and *rpa43-chim7*. N-terminal or C-terminal deletions are symbolised by

horizontal thin lines. (+), (ts) and (-) stand for wild-type like growth, temperature sensitivity (37°C) and no growth at all.

B. Growth properties of *rpa43* mutants. Strain D101-12 (*rpa43Δ* / *URA3 CEN RPA43*, see Supporting Information) was transformed with the *TRP1* plasmids pFB63 (*rpa43-35,326*), pFB64 (*rpa35-1,235*), pGA43-chim2 (*rpa43-chim2*) and pGEN-RPA43 (*RPA43+*). Transformants were replica plated on 5'-fluoro-orotate medium (FOA) to chase the YCPA43-12 (*URA3 CEN RPA43*) host plasmid (3). Mutants were spotted on YPD and incubated for three days at the appropriate temperature.

C. Two-hybrid interaction between Rpa14 and *rpa43* mutants. The complete coding sequence of *RPA43* and various *rpa43* mutants (Supporting Information) fused to the C-end of GAL4BD (1-147) were tested for their interaction with Rpa14 fused to the N-end of GAL4AD (pGP13). Two-hybrid interactions were monitored by a β -galactosidase overlay assay (30).

rpa49Δ, *rpa34Δ* and *rpa12Δ* genetically interact with *rpa43* mutants

We have previously reported (Beckouet *et al.*, submitted for publication) that the cold sensitive defect of *rpa49Δ* is suppressed by *rpa43-35,326*, removing the short non-conserved N-end of Rpa43. On the other hand, *rpa49Δ* turned out to be synthetic lethal with the wild type-like (*rpa43-chim1*, *rpa43-1,235*) or conditionally defective (*rpa43-chim2*) mutants altering the conserved central domain of Rpa43, as summarised in Figure 3 below. A similar lethality or severe growth defect was observed when combining *rpa43-chim1*, *rpa43-chim2* and *rpa43-1,235* with *rpa34Δ* and *rpa12Δ*, lacking the other two non-essential subunits of RNA polymerase I, or with *rrn3-8*, a conditionally-defective mutant of Rrn3 (Figure 3). This is not a general property of RNA polymerase I mutants, since two *rpa135* mutants previously described to be defective in transcription elongation (Beckouet *et al.*, submitted for publication) were not affected by these *rpa43* mutants. Moreover, non lethality or reduced growth was observed with *top1Δ* or *hmo1Δ*, lacking respectively the eponymous type 1 DNA topoisomerase and the HMG Box factor akin to the UBF factor of animal Pol I, although both mutants are lethal with *rpa49Δ* (16). Taken together, these results suggest that Rpa49, Rpa34 and Rpa12 co-operate with Rpa43 to ensure an optimal Rpa43-Rrn3 interaction *in vivo*.

A

	WT	<i>rpa12Δ</i>	<i>rpa34Δ</i>	<i>rpa49Δ</i>	<i>rrn3-8</i>	<i>hmo1Δ</i>	<i>rpa135-D395N L656P</i>	<i>top1Δ</i>
<i>RPA43⁺</i>	++	ts	++	cs, ts	ts	cs	++	+
<i>chim1</i>	++	-	ts	-	-	cs	++	+
<i>chim2</i>	+, ts	-	-	-	-	cs, (+) ⁺ , ts	+, ts	+
1, 235	++	-	-	-	-	cs	++	+
1, 265	++	ts	++	cs, ts	ts	cs	++	+
1, 281	++	ts	++	cs, ts	ts	cs	++	+
35, 326	++	ts	++	SUP	ts	cs	++	+
35, 281	++	-	++	SUP	ts	cs	++	+

B

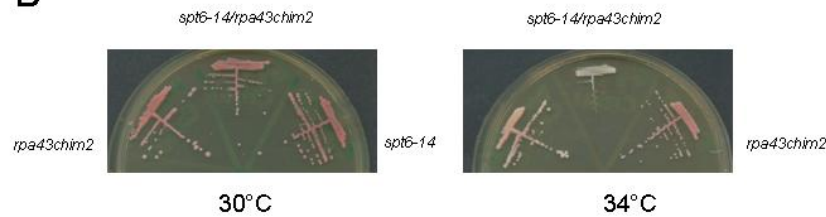


Figure 3. Genetic interactions of *rpa43* mutations.

A Synthetic effects between *rpa43* and *rpa49Δ* or *rpa34Δ* mutations. Strains D101-I2 (WT), SL32-5B (*rpa12Δ*), SL27-2B (*rpa34Δ*), D710-8A (*rpa49Δ*), GPY21 (*rrn3-8*), SL28-9B (*hmo1Δ*), SL54-2A (*rpa135-L656P*), SL55-3A (*rpa135-D395N*) and D698-12A (*top1Δ*) were transformed with pGEN plasmids bearing the wild-type *RPA43*, or the corresponding *rpa43* mutant (Supporting Informations). Transformants were replica plated on FOA medium to chase the host plasmid *YCP43-12*.

B. Synthetic effect between *rpa43-chim2* and *spt6-14* mutations. Strain D101-I2 (*rpa43Δ* / *URA3 CEN RPA43*) and Gpy13 (*spt6-14 rpa43Δ* / *URA3 CEN RPA43*) were transformed with the *TRP1* plasmids pGA43-chim2 (*rpa43-chim2*) and pGEN-RPA43 (*RPA43⁺*). Transformants were replica plated on 5'-fluoro-orotate medium (FOA) to chase the YCPA43-12 (*URA3 CEN RPA43*) host plasmid. Strains were spotted on YPD and incubated for three days at the appropriate temperature.

Rpa43 interacts with Spt5 and Spt6 in a two-hybrid assay

To identify putative partners of Rpa43, we used a Gal4BD::RPA43 fusion as bait in an exhaustive two-hybrid screening based on a library of yeast genomic fragments fused to the Gal4_{AD} domain (described in (13, 14, 30). As described previously, this screen showed that

Rpa43 interacts with Rpa14 ((30) and Figure 2), but it also yielded one clone harbouring a fragment of Spt5 (551-614) and two clones encoding a fragment of Spt6 (1224-1423) (Figure 4A and 4B). The two-hybrid interaction between Rpa43 and Spt5 is consistent with previous studies which showed that Spt5 and its partner Spt4 co-purified with Pol I (25). Moreover, (36) recently reported that Spt5 may directly participate in rDNA transcription.

To delineate which domains of Rpa43 are involved in these interactions, we tested the Gal4AD::Spt5(551-614) and Gal4AD::Spt6(1224-1423) clones identified above for their ability to bind Gal4_{BD}::Rpa43 fusions progressively truncated at the N-terminus (*rpa43-36,326*, *rpa43-80,326* and *rpa43-122,326*, respectively) and at the C-terminus (*rpa43-1,280*, *rpa43-1,239*, and *rpa43-1,161*, respectively). This analysis was also applied to the Gal4AD::RPA14 fusion. As shown in Figure 5, the ability to bind Spt6 or Rpa14 was retained when deleting the 36 N-terminal residues or 45 C-terminal amino acids of Rpa43, but was lost in more extensive deletions, and thus was born by a domain corresponding roughly to the conserved part of the Rpa43 subunit. On the other hand, all of the mutations tested abolished the interaction of Rpa43 with Spt5.

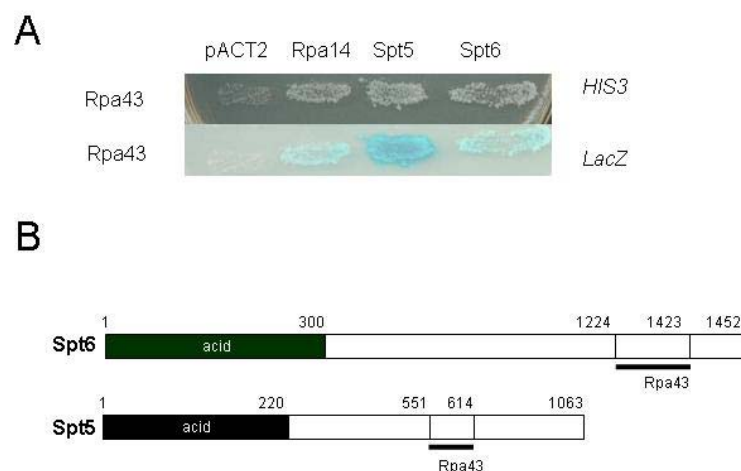


Figure 4. Interaction between Rpa43 and elongation transcription factors Spt5 and Spt6.

Interaction between Rpa43 and elongation transcription factors Spt5 and Spt6.

A. Spt5 and Spt6 are Rpa43 partners in two hybrid assay. Two-hybrid interactions between the Gal4_{BD}::RPA43 (pGP9) and Gal4AD::RPA14 (pGP13). Activation of the *LacZ* and *HIS3* reporter genes was monitored by blue color in the presence of X-gal and by growth in the presence of 50 mM 3-aminotriazol, respectively.

B. General organisation of Spt6 and Spt5. A horizontal thick line denote the domain of Spt5 and Spt6 supporting a two hybrid interaction with Rpa43.

These two-hybrid data indicate that specific domains of Spt5 and Spt6 are able to bind Rpa43 in the relatively physiological context of a two-hybrid assay and that Rpa43 might therefore be a direct target of these two factors when participating in rDNA transcription (36). To

further check the biological relevance of these interactions, we investigated whether the *rpa43-chim2* mutant allele showed any genetic interaction with *spt6-14* and *spt5-194* mutations (4). As shown in Figure 3B, *spt6-14* distinctly reduced growth when combined with *rpa43-chim2*, but no effect was seen in the *spt5-194 rpa43-chim2* double-mutant (data not shown).

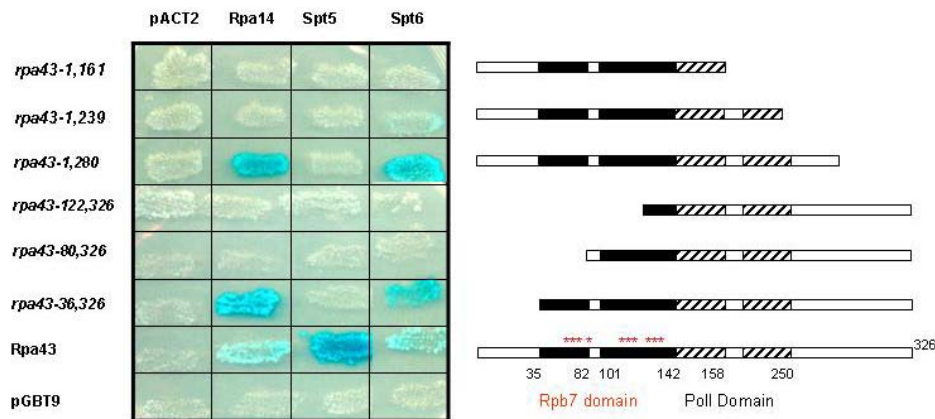


Figure 5. Interaction domains of Rpa43. The complete coding sequence of Rpa43 and various N-terminal and C-terminal deletions fused to the C-end of GAL4BD (1-147) were tested for their interaction with *spt5-551, 614* (pACT43-210), *spt6-1224, 1423* (pACT43-19) and Rpa43 (pGP13).

If the association between Spt5/Spt6 and Rpa43 takes place at the site of transcription, Spt5 and Spt6 should be detected in the nucleolus, and not only in the nucleoplasm as predicted if they were specifically associated to RNA polymerase II. We therefore investigated the intracellular location of yeast Spt5 and Spt6 using fluorescence microscopy. Therefore, Spt5 and Spt6 were tagged with yellow fluorescent protein (YFP) in the strain OGFP69-1A containing the nucleolus factor Hmo1 tagged with CFP (GFP variant). When both YFP and CFP signal were combined we observed some YFP-Spt5 and Spt6-YFP staining overlapping the CFP-Hmo1 staining (Figure 6A). As a control, we analysed an Rpb3-YFP strain where the Pol II Rpb3 subunit is tagged with YFP. Unlike that observed with Spt5 and Spt6 proteins, Rpb3 staining was restricted to the nucleoplasmic compartment, showing no overlap with Hmo1 staining (Figure 6A). Unlike Schneider *et al.* (2006), however, we have no clear evidence that Spt5 and Spt6 are associated to the rDNA transcribed region compared with a non-transcribed control rDNA fragment, whereas these proteins are successfully found at the *GAL1* coding region in an experimental control (Figure 6B).

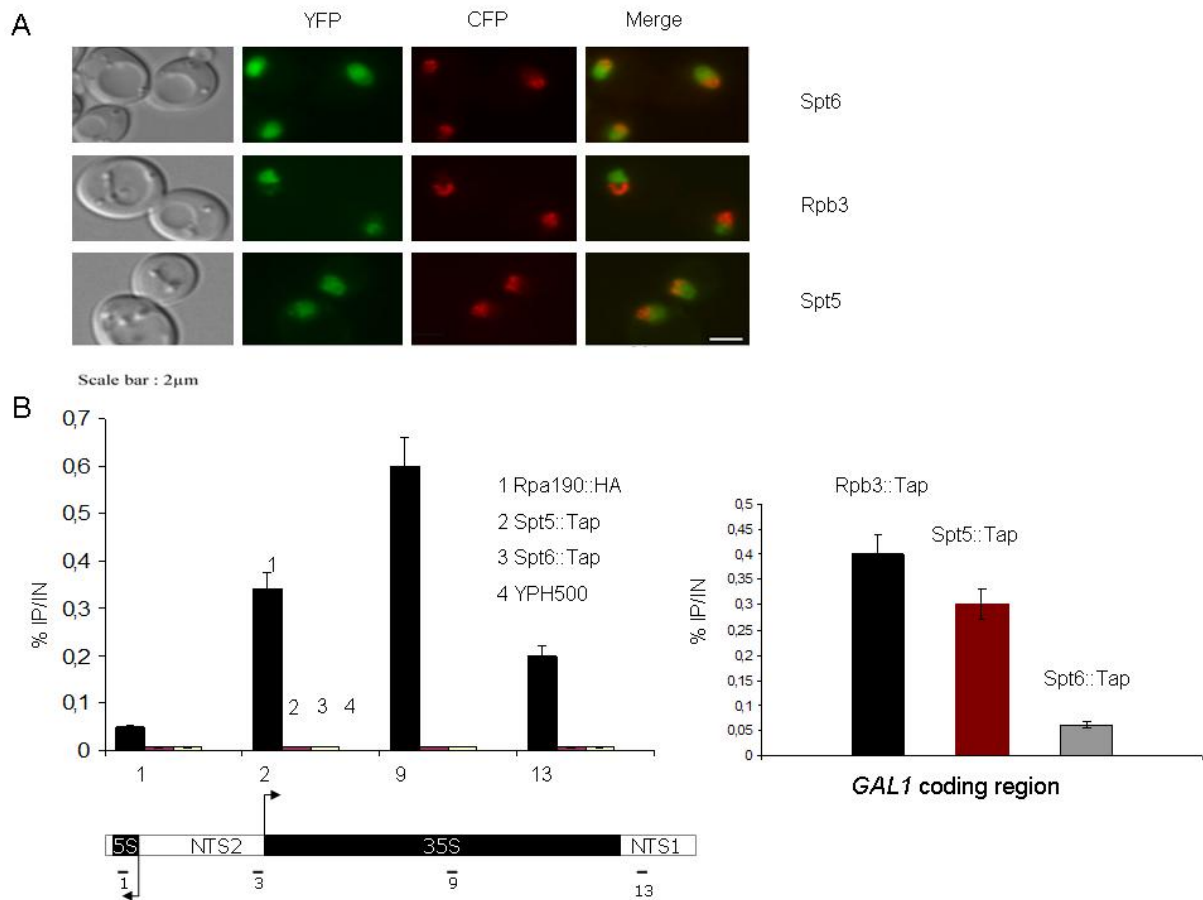


Figure 6. Localisation of Spt5 and Spt6.

A. *In vivo* localisation of Spt5 and Spt6. Spt5, Spt6 or Rpb3 were tagged with YFP in the strain OFP69-1A containing the nucleolus factor Hmo1 tagged with CFP and visualized as described in Materials and Methods (scale bar corresponds to 2 μ m).

B. ChIP with Spt5, Spt6, Rpb3 and Rpa190 on rDNA and *GAL1* gene. ChIP was performed with strains YNJK4 (Spt5::TAP), YNJK6 (Spt6::TAP), YNJK12 (Rpb3::TAP) and MW3522 (Rpa190::HA) (13, 21). Spt5::TAP, Spt6::TAP and Rpb3::TAP were immunoprecipitated with rabbit IgG antibodies. Rpa190::HA was immunoprecipitated with anti-hemagglutinin A mouse antibodies (12CA5). DNA occupancy is defined by the ratio between the IP signal and the DNA input signal. Primers used for ChIP are listed in Supporting Information. In the case of primers used for ChIP on the rDNA, the position relatively to the 5S and 35S transcripts and their non-transcribed spacers NTS1 and NTS2 are indicated by horizontal bars. The start site and transcription orientation are denoted by arrows.

DISCUSSION

Rpa43 belongs to a conserved family of archaeal and eukaryotic RNA polymerase subunits, but differs from other members of that family by an RNA polymerase I-specific domain (positions 139-248 in the *S. cerevisiae* subunit) that might be the binding site of Rrn3 initiation factor. In *S. cerevisiae*, Rpa43 also contains poorly conserved N-terminal and C-terminal extensions that are not found in the *S. pombe* subunit but, in contrast to mutants of the conserved domains, they can be deleted with no detectable growth defect or synthetic lethal interactions with other subunits of RNA polymerase I. The *S. pombe* subunit is not functional in *S. cerevisiae*, but functional constructions based on domain swapping suggest that its inability to complement the *S. cerevisiae* *rpa43Δ* null allele is due to a short insert of thirteen amino acids interrupting the Rpb7/Rpc25-like domain of Rpa43 in *S. cerevisiae* and other hemiascomycetous yeasts. We recently showed that one of these mutants, *rpa43-chim2*, strongly reduces the recruitment of Rrn3 at the rDNA promoter, with a parallel decrease in Pol I occupancy (beckouet et al., submitted for publication), which supports the idea that Rrn3 needs to first bind Rpa43 (therefore forming an Rrn3-Pol I complex) in order to be loaded on rDNA (31).

The Rpb7/Rpc25 like domain of Rpa43 (positions 45-138) contains thirteen amino acids that are also strongly conserved in the RpoE subunit of archaea and obviously fulfilling some common function shared by the archaeal and eukaryotic transcription systems. In RNA polymerase II (1, 6), the corresponding Rpb7 amino acids are distributed on the inner part of the 'stalk' fold, close to the Rpb6 subunit common to RNA polymerase I, II and III, and to the docking site of TFIIB on Rpb1. TFIIB bears no sequence similarity to Rrn3 but is distinctly related to the Brf1 initiation factor of RNA polymerase III and to TFB in archaea. Unlike Rrn3, these initiation factors are thought to first bind their target promoters and to then recruit their cognate RNA polymerase (6, 8, 9, 34). It is tempting to speculate that the Rpb7/Rpc25 like domain triggers a conformational change in archaeal and eukaryotic RNA polymerases once they have been recruited to the promoter region, and making their catalytic site competent to start transcription, and may also be important for promoter opening the DNA bubble as a prelude to transcription start.

As argued elsewhere (Beckouet et al., submitted for publication), the Rpa49/Rpa34 heterodimer also contributes to the transcriptional specificity of RNA polymerase I, along with Rpa43 and Rpa14, by forming and dissociating the Rrn3-RNA polymerase I complex. The third non essential subunit of RNA polymerase I, Rpa12, is known to play a role in

transcription termination (32) but may also contribute to the Rrn3 binding and dissociation cycle since its null mutant, *rpa12Δ*, becomes lethal when the stalk structure is altered. Rpa12 is located opposite to the Rpa43/Rpa14 stalk in the spatial structure of RNA polymerase I (2), but a recent study suggests that it is close to the Rpa49/Rpa34 (Kuhn *et al.*, submitted for publication). Moreover, the triple mutant *rpa49Δ rpa34Δ rpa12* (16) is viable, and this epistasis reinforces the idea that the three non essential subunits work together in this transcriptional specificity.

In the course of this study, we observed that Spt5 and Spt6, initially characterised as elongation factors associated with RNA polymerase II, interact with Rpa43 in a two-hybrid assay. We cannot strictly rule out that these interactions mimic a truly physiological interaction relating Spt5 and/or Spt6 to the Rpb7 subunit of RNA polymerase II. However, they are supported by previous studies indicating that Spt5 co-immunopurified with RNA polymerase I (25) and that Spt5 and Spt6 might directly participate in rDNA transcription (37). Moreover, they are also consistent with our data suggesting that the nucleocytoplasmic localisation of Spt5 and Spt6 extends to the nucleolus. Other factors that affect elongation by RNA polymerase II have been recently implicated in rDNA transcription. The Fcp1 phosphatase dephosphorylates (7) the Rpb1 C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II and is generally required for mRNA synthesis in yeast, but it was also reported that *fcp1* mutants have defects in rDNA transcription and that Fcp1 stimulates RNA polymerase I *in vitro* (11). Conversely, the Ctk1 subunit of the CTDK-1 kinase phosphorylating the Ser-2 position of the CTD copurifies with RNA polymerase I and a *ctk1Δ* deletion partly impairs rDNA transcription (7). Finally, the human TFIIH and CSB (5, 19) proteins were also reported to co-operate with RNA polymerase I, thus arguing for a strong degree of similarity between RNA elongation by RNA polymerase I and II.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank M. Riva for generously providing us with polyclonal antibodies, M. Fromont-Racine for a two-hybrid yeast library, and C. Carles, O. Gadai, M. Kwapisz, M. Riva, E. Shematorova, J. Soutourina, M. Werner and M. Wéry for insightful discussions. This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer (F.B.)

S.1 Sequence conservation of Rpa43 and Rpa14. Conserved amino acids were defined by the following groups : ILMV, ST, DN, DE, EQ, AG, FYW, KR. Stars above the Rpb7-like domain of Rpa43 correspond to amino acid positions also conserved in Rpb7 (Pol II) and Rpc25 (Pol III). Species symbols as follows : Sc (*Saccharomyces cerevisiae*), Sp (*Schizosaccharmyces pombe*), An (*Aspergillus nidulans*), Hs (*Homo sapiens*), Dd (*Dictyostelium discoideum*), At (*Arabidopsis thaliana*), Pf (*Plasmodium falciparum*), Gl (*Giardia lamblia*), Tt (*Tetrahymena thermophila*) and Pr (*Phytotpora ramorum*). In the latter case, homology corresponds to a partial amino acid sequence deduced from a TBLASTN analysis.

```

RPA43
Rpb7 like domain
      * * * * *
Sc 45 LYSIAPMYLENFLQGVMKQHLNPLVMKYNKNGVVLGYEGLKILDADPLSKEDTSEKLIKITPDTFPGPTWCHVNLVWQFQVGD-VLEGYIP
Sp 13 LYLSTAPGHSRDFLNATIQ-EHMDSMILSKLPRINGIVLAYDNIRFLEK-----SAKVMYDSFPSPFWVRVDVLVSPFKKG-DLEGGKIN
Hs 55 RHIALSPRYLNRKRTGIREQLDAELLR-YSBSLLGVP IAYDNIRVVE-----LSDIYDQGH IHLNIEADFLVPCFEPGQ-KIMGVVN
Dd 26 LSLQLPMDTQSLCSGK-SMLDRLVFKYKTELGGIIISYDVVHTDK-----EAKIFYDSFYLGMNIRHVKPLVFKPFKQ-Q-IINGVVK
At 11 LMIFIHPSQSRNVPGIC-RELSLLPQYNETPDGVLATDATVKSQ-----AKILTGLHPIFGVRNVKPLVFKPFKQ-PVEGKIV
Pf 69 CVAQIAPKYLKKIDGIG-VLSENFMKANHVEGFLCENKIKLKEK-----ESRVMNDPFINPVKISFKLLILVLKENTETAKIN
Gl 11 LRLAVLPGLEWYKSK-AHLNQYLPNLLPTQSLLGKDIELIGS-----TAALTHTSHNVHFTARCTLPLPPEPES-LHATIK
Tt 20 ELIPLYPDLRLNKLNSLK-NPVQKKLP-KWDQHQGIVLQCKNIKSSS-----KASIHDSFPVIFVPCSTLLPPEPFGD-VPLQVVT
Pr xxx ??VLSLPCAMEFRVGLR-QELTEQLMRYSEALKGVVLSFSDVQLARF-----NGTIVNEMFYIHCKVQADALVFRPKQGM-KLRGIVN

Pol I-specific domain
Sc 139 IQSASHIGLLIHDPASNAIKKNNIPV-DWTFVHNDVEEDADVI (NNN) SNGGSENLGKPSGNGSLCHWVDSNGEPIDGKL--RFTVPMVHTT--GRVSVSDTL 249
Sp 95 LVSPSHIGLLILGIFNASIPKKSIPK-DWTFVHNDVEEDADVI (NNN) SNGGSENLGKPSGNGSLCHWVDSNGEPIDGKL--RFTVPMVHTT--GRVSVSDTL 170
Hs 137 KVSSSHIGLLVHGFNASIPKKBQL-----SARQWQTMENIMGDEL--EFVVFRLDSQ-AAGVFCIRGKL 198
Dd 108 RVSTTHISLLVGTISASIPKSNIPK-SFAPDHS-----SNMFMNKQTKATISVGTAKAFKVIDVSD--KHNIGIQGDM 179
At 94 KISPSIHVIVLG-PSAAVITDVIDKEPKVVRD-----GEGSPVSRSHKRHALKGTMLRLQVQSPD--EEVMHIGSL 165
Pf 152 KIEPLKIHLDIFG-IVEAIFSEDMPK-DHYDSRNNRFR-----REGKFPPLDYDILPTIKKITVGDNGANVKVIGYF 222 (C-end)
Gl 93 HTWFRPIYLLFRGSLPVVYSDPGV---RYLYKQGVYCDKDDTGBQLTTDMVLQVRVKSFGV--RKGSYAITCSMDPPEYRIVSKPEPVATEETSIVDGVDSV 190
Tt 102 QTFNTHISLQLPGLFNLIYADDISDKILKLN-----DDSENVDAKENTVIEVSDDIQFEVKTVLDLQEPGDFMLIGSL 174
Pr xxx KIGSNHVQMLFAGVFNSEVSEALP-KGVV??

RPA14
Sc 27 LPQHVSDEVLQFLESFIDEKENIIDSTMTNTISGNAADAAAANTSLNIDTNLSSISQLKRIQRDPFGLPFA 102
An 50 GENLLFVRKXTNIFVPRVYALYTKFRTGKYI--VMBQVHGETLQSLWFLTSFEKDSIMSTWRAVFELESLPFP 123
Sp 9 MLRKSEKLDKDAASKFLNRYIQTIERRFQDEKSGSESVLSQLNRVLMYKGEIPLISINLPVQGPFTTELIIFPE 84

```

S.2 Strains

Strain	Genotype	Origin/Parents
D101-H3	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 (44)
D101-I2	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 (44)
D710-8A	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 rpa49::KanMX4 // YCPA43 CEN URA3 RPA43)</i>	D101-H3, Y01196
GPy21	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 rrn3-8 ura3-52 trp1 leu2 his3Δ200 his7-2 ade5 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	(31)
SL27-2B	<i>MATa ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3Δ200 leu2Δ1 rpa43Δ::LEU2 rpa34Δ::HIS3// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	T4-1C, D101-H3
SL54-2A	<i>MAT ade2 ura3 lys2 trp1 his3 leu2 rpa43Δ::LEU2 rpa135-L656P::LYS2// YCPA43 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2, OG36-1A (submitted for publication)
SL55-3A	<i>MAT ade2 ura3 lys2 trp1 his3 leu2 rpa43Δ::LEU2 rpa135-D395N::LYS2// YCPA43 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2, SL46-1D
SL32-5B	<i>MATa ade2-1 ura3-53 lys2 -801 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 rpa43Δ::LEU2 rpa12::Δleu2::HIS3 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	SL29-2C(16), D101-H3
SL28-9B	<i>MATa ade2-1 ura3-53 lys2 -801 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 rpa43Δ::LEU2 hmo1Δ::HIS3 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-H3 (15), SL13-1A
D698-12A	<i>MATa ade2-1 ura3 lys2 trp1-Δ63 his3 leu2-Δmet15-Δ0 rpa43Δ::LEU2 top1Δ::KanMX4 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-H3, Y01697
Gpy13	<i>MAT ade2-1 ura3-52 trp1-Δ63 leu2-Δ1 rpa43Δ::LEU2 spt6-14 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-12 (4), FY957
yBF 41	<i>MATa ade2-1 ura3-52 his3-11,15 trp1-Δ2 leu2-Δ1can1-100 HMO1::CFP-TRP1 SPT6::YFP-HIS3</i>	BMA64
yBF 40	<i>MATa ade2-1 ura3-52 his3-11,15 trp1-Δ2 leu2-Δ1can1-100 HMO1::CFP-TRP1 SPT5::YFP-HIS3</i>	BMA64
yBF 47	<i>MATa ade2-1 ura3-52 his3-11,15 trp1-Δ2 leu2-Δ1can1-100 HMO1::CFP-TRP1 RPB3::YFP-HIS3</i>	BMA64
YPH500	<i>MATa ura3-52 ade2-1 lys2-801 his3Δ200 trp1Δ63 leu2Δ</i>	(41)

S.3 Plasmids

Plasmid	Yeast gene	Backbone vector
pGP13	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::RPA14</i>	pACT2 (13)
pGP9	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::RPA43</i>	pGBT9 (13)
pFB44	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-chim1</i>	pVV212*
pFB45	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-chim2</i>	pVV212
pFB46	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-35,281</i>	pVV212
pFB48	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-1,235</i>	pVV212
pFB49	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-1,265</i>	pVV212
pFB490	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-35,326</i>	pVV212
pFB491	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-1,281</i>	pVV212
pEL 25	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::Rpa43 (81-326)</i>	pGBT9
pEL 26	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::Rpa43 (123-326)</i>	pGBT9
pEL 24	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::Rpa43 (37-326)</i>	pGBT9
pEL 23	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::Rpa43 (1-161)</i>	pGBT9
pEL 21	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::Rpa43 (1-239)</i>	pGBT9
pEL 20	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::Rpa43 (1-280)</i>	pGBT9
pACT43-210	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::Spt6 (1224-1423)</i>	Peyroche thesis
pACT43-19	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::Spt5 (551-614)</i>	Peyroche thesis
pFB61	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,281</i>	pVV200 (45)
pFB62	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,265</i>	pVV200
pFB63	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,326</i>	pVV200
pFB64	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,235</i>	pVV200
pFB65	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,235</i>	pVV200
pFB66	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,281</i>	pVV200
pFB67	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,216</i>	pVV200
pGA43-chim1	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim1</i>	pGEN (38)
pGA43-chim2	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim2</i>	pGEN
pGA43-chim4	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim4</i>	pGEN
pGA43-chim7	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim7</i>	pGEN
pGEN-RPA43	<i>TRP1 pPGK::RPA43</i>	pGEN

* Gateway® versions of pGBT9, V. Van Mullem & M. Wéry, personnel communication.

S4. List of the primers used in ChIP assays.

	Sequence	
rDNA1	1F TCGCGTATGGTCACCCACTAC 1R GTTGCGGCCATATCTACCAGA	-1345, -1245 (relatively to 5' end of the 35S pre-rDNA)
rDNA4	4F CTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGC 4R CCACAGTTATACCATGTAGTAAAGGAACT	+731, +855
rDNA9	TATGAGGTAAAGCGAATGATTAGAGG CACGTTCAATTAAGTAACAAGGACTTCT	+4239, +5015
rDNA13	CTCATTTCTTATAGTTAACAGGACATGC TTCACCTGTCTCTTACATCTTTCTTGG	+6947, +7048
PYK1	PYK1P1 CGCACCGTCACAAAGTGTT PYK1P2 TGGGAAGGAAAGGAAATCAC	-444, -285 (relatively to the <i>PYK1</i> ATG)

1. **Armache, K. J., H. Kettenberger, and P. Cramer.** 2003. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6964-8.
2. **Bischler, N., L. Brino, C. Carles, M. Riva, H. Tschochner, V. Mallouh, and P. Schultz.** 2002. Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *EMBO J.* **21**:4136-4144.
3. **Boeke, J. D., F. Lacroute, and G. R. Fink.** 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**:345-346.
4. **Bortvin, A., and F. Winston.** 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* **272**:1473-6.
5. **Bradsher, J., J. Auriol, L. Proietti de Santis, S. Iben, J. L. Vonesch, I. Grummt, and J. M. Egly.** 2002. CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* **10**:819-29.
6. **Bushnell, D. A., and R. D. Kornberg.** 2003. Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6969-73.
7. **Chambers R. S., K. C. M.** 1996. Purification and characterization of an RNA polymerase II phosphatase from yeast. *J. Biol. Chem* **271**:24498-24504.
8. **Chen, H. T., and S. Hahn.** 2003. Binding of TFIIIB to RNA Polymerase II. Mapping the Binding Site for the TFIIIB Zinc Ribbon Domain within the Preinitiation Complex. *Mol Cell* **12**:437-47.
9. **Chédin, S., M. L. Ferri, G. Peyroche, J. C. Andrau, S. Jourdain, O. Lefebvre, M. Werner, C. Carles, and A. Sentenac.** 1998. The yeast RNA Polymerase III transcription machinery: a paradigm for eukaryotic gene activation. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **63**:381-389.
10. **Devaux, S., L. Lecordier, P. Uzureau, D. Walgraffe, J. F. Dierick, P. Poelvoorde, E. Pays, and L. Vanhamme.** 2006. Characterization of RNA polymerase II subunits of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **148**:60-8.
11. **Fath, S., M. S. Kobor, A. Philippi, J. Greenblatt, and H. Tschochner.** 2004. Dephosphorylation of RNA polymerase I by Fcp1p is required for efficient rRNA synthesis. *J Biol Chem* **279**:25251-9.
12. **Fernandez-Tornero, C., B. Bottcher, M. Riva, C. Carles, U. Steuerwald, R. W. Ruigrok, A. Sentenac, C. W. Muller, and G. Schoehn.** 2007. Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol Cell* **25**:813-23.
13. **Flores, A., J. F. Briand, C. Boschiero, O. Gadal, J. C. Andrau, L. Rubbi, V. Van Mullem, M. Gousot, C. Marck, C. Carles, P. Thuriaux, A. Sentenac, and M. Werner.** 1999. A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**:7815-7820.
14. **Fromont-Racine, M., J. C. Rain, and P. Legrain.** 1997. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genetics* **16**:277-282.

15. **Gadal, O., S. Labarre, C. Boschiero, and P. Thuriaux.** 2002. Hmo1, an HMG-Box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.* **21**:5498-5507.
16. **Gadal, O., S. Mariotte-Labarre, S. Chédin, E. Quémeneur, C. Carles, A. Sentenac, and P. Thuriaux.** 1997. A34.5, a non-essential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machinery. *Molecular and Cellular Biology* **17**:1787-1795.
17. **Hartzog, G. A., T. Wada, H. Handa, and F. Winston.** 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**:357-69.
18. **Huet, J., J. M. Buhler, A. Sentenac, and P. Fromageot.** 1975. Dissociation of two polypeptide chains from yeast RNA polymerase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **72**:3034-3038.
19. **Iben, S., H. Tschochner, M. Bier, D. Hoogstraten, P. Hozak, J. M. Egly, and I. Grummt.** 2002. TFIIF plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* **109**:297-306.
20. **Jasiak, A. J., K. J. Armache, B. Martens, R. P. Jansen, and P. Cramer.** 2006. Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell* **23**:71-81.
21. **Krogan, N. J., W. T. Peng, G. Cagney, M. D. Robinson, R. Haw, G. Zhong, X. Guo, X. Zhang, V. Canadien, D. P. Richards, B. K. Beattie, A. Lalev, W. Zhang, A. P. Davierwala, S. Mnaimneh, A. Starostine, A. P. Tikuisis, J. Grigull, N. Datta, J. E. Bray, T. R. Hughes, A. Emili, and J. F. Greenblatt.** 2004. High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* **13**:225-39.
22. **Laferté, A., E. Favry, A. Sentenac, M. Riva, C. Carles, and S. Chédin.** 2006. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* **20**:2030-40.
23. **Lanzendörfer, M., A. Smid, C. Klinger, P. Schultz, A. Sentenac, C. Carles, and M. Riva.** 1997. A shared subunit belongs to the eukaryotic core RNA polymerase. *Genes and Development* **11**:1033-1047.
24. **Liljelund, P., M. Mariotte, J. M. Buhler, and A. Sentenac.** 1992. Characterization and mutagenesis of the gene encoding the A49 subunit of RNA polymerase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**:9302-9305.
25. **Lindstrom, D. L., S. L. Squazzo, N. Muster, T. A. Burckin, K. C. Wachter, C. A. Emigh, J. A. McCleery, J. R. Yates, 3rd, and G. A. Hartzog.** 2003. Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol* **23**:1368-78.
26. **Meka, H., G. Daoust, K. B. Arnvig, F. Werner, P. Brick, and S. Onesti.** 2003. Structural and functional homology between the RNAP(I) subunits A14/A43 and the archaeal RNAP subunits E/F. *Nucleic Acids Res* **31**:4391-400.
27. **Nogi, Y., L. Vu, and M. Nomura.** 1991. An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**:7026-7030.
28. **Nogi, Y., R. Yano, and M. Nomura.** 1991. Synthesis of large rRNA by polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**:3962-3966.
29. **Nomura, M.** 1999. Regulation of ribosome biosynthesis in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and common principles. *Journal of Bacteriology* **181**:6857-64.
30. **Peyroche, G., E. Levillain, M. Siaut, I. Callebaut, P. Schultz, A. Sentenac, M. Riva, and C. Carles.** 2002. The A14-A43 heterodimer subunit in yeast RNA pol I and their relationship to Rpb4-Rpb7 pol II subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14670-5.
31. **Peyroche, G., P. Milkereit, N. Bischler, H. Tschochner, P. Schultz, A. Sentenac, C. Carles, and M. Riva.** 2000. The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *EMBO Journal* **19**:5473-82.
32. **Prescott, E. M., Y. N. Osheim, H. S. Jones, C. M. Alen, J. G. Roan, R. H. Reeder, A. L. Beyer, and N. J. Proudfoot.** 2004. Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6068-73.
33. **Proshkina, G. M., E. K. Shematorova, S. A. Proshkin, C. Zaros, P. Thuriaux, and G. V. Shpakovski.** 2006. Ancient origin and fast evolution of DNA-dependant RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **34**:3615-3624.
34. **Qureshi, S. A., S. D. Bell, and S. P. Jackson.** 1997. Factor requirements for transcription in the archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO Journal* **16**:2927-2936.
35. **Rudra, D., and J. R. Warner.** 2004. What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev* **18**:2431-6.

36. **Schneider, D. A., S. L. French, Y. N. Osheim, A. O. Bailey, L. Vu, J. Dodd, J. R. Yates, A. L. Beyer, and M. Nomura.** 2006. RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
37. **Schneider, D. A., and M. Nomura.** 2004. RNA polymerase I remains intact without subunit exchange through multiple rounds of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15112-7.
38. **Shpakovski, G. V., J. Acker, M. Wintzerith, J. F. Lacroix, P. Thuriaux, and M. Vigneron.** 1995. Four subunits shared by the three classes of RNA polymerases are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:4702-4710.
39. **Shpakovski, G. V., and E. K. Shematorova.** 1999. [Characteristics of the cDNA of the *Schizosaccharomyces pombe* rpa43+ gene: structural similarity of the Rpa43 subunit of RNA-polymerase I with the Rpc25 subunit of RNA-polymerase III]. *Bioorg Khim* **25**:791-6.
40. **Siaut, M., C. Zaros, E. Levivier, M. L. Ferri, M. Werner, I. Callebaut, P. Thuriaux, A. Sentenac, and C. Conesa.** 2003. A Rpb4/Rpb7 like complex in yeast RNA Polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol* **23**:195-205.
41. **Sikorski, R. S., and J. D. Boeke.** 1991. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods in Enzymology* **194**.
42. **Smid, A., M. Riva, F. Bouet, A. Sentenac, and C. Carles.** 1995. The association of three subunits with yeast RNA polymerase I is stabilized by A14. *Journal of Biological Chemistry* **270**:1354-13540.
43. **Swanson, M. S., M. Carlson, and F. Winston.** 1990. SPT6, an essential gene that affects transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes a nuclear protein with a extremely acidic terminus. *Mol. Cell. Biol.* **10**:4935-4941.
44. **Thuriaux, P., S. Mariotte, J. M. Buhler, A. Sentenac, L. Vu, B. S. Lee, and M. Nomura.** 1995. Gene RPA43 in *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential subunit of RNA polymerase I. *Journal of Biological Chemistry* **270**:24252-24257.
45. **Van Mullem, V., M. Wery, X. De Bolle, and J. Vandenhaute.** 2003. Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**:739-46.
46. **Wéry, M., E. Shematorova, B. Van Driessche, J. Vandenhaute, P. Thuriaux, and V. Van Mullem.** 2004. Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS. *Embo J* **23**:42132-42142.

CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre étude fonctionnelle des sous-unités Rpa34 et Rpa49 a montré qu'elles forment un hétérodimère où la composante Rpa49, bien que non essentielle, joue un rôle critique, dans un changement de conformation majeur accompagnant la mise en route de la transcription proprement dite. L'absence de Rpa49 (ou plus précisément son extrémité C-terminale) conduit en effet à un défaut de recrutement du complexe ARN polymérase I/Rn3 (d'où une croissance ralentie à 30 et 25°C), mais aussi à une forte instabilité de l'ARN polymérase I en présence de mycophénolate corrélée à la non-dissociation de Rn3 de l'ARN polymérase I en élongation. Le rôle de Rpa34 est moins critique mais nos données suggèrent fortement qu'elle stabilise Rpa49 sur l'ARN polymérase I et qu'elle assure donc peut être une conformation optimale de Rpa49. Durant la rédaction de ce manuscrit, Patrick Cramer nous a aimablement communiqué les résultats obtenus par son laboratoire et celui de Herbert Tschochner. Par une analyse structurale, ces auteurs ont aussi conclu que Rpa49 et Rpa34 forment un hétérodimère. Ce travail montre en outre, qu'une ARN polymérase dépourvue de cet hétérodimère est défectueuse en élongation *in vitro*.

On commence donc à mieux comprendre le rôle des quatre sous-unités non-catalytiques organisées en deux dimères (Rpa43/Rpa14 et Rpa34/Rpa49) où Rpa43 est strictement essentielle *in vivo*. Une cinquième sous-unité, Rpa12, se rattache sans doute à cet ensemble fonctionnel puisqu'elle est non essentielle et que le triple mutant *rpa12Δ rpa34Δ rpa49Δ* n'aggrave pas le phénotype des simples mutants *rpa12Δ* ou *rpa49Δ*.

Je discute ci-dessous quelques questions qu'il me semble important d'aborder expérimentalement à la suite de ce travail.

Quelle est l'origine du double rôle de Rpa49 ?

Nous avons conclu de nos données qu'il y a au moins deux effets dans les mutants *rpa49*. Le premier est de réduire la présence de l'ARN polymérase sur l'ADNr. Cette diminution peut s'expliquer par un défaut de recrutement de l'ARN polymérase I car un mutant (*rpa43-35,326*) de Rpa43 qui intervient elle-même dans le recrutement de l'ARN polymérase I supprime ce défaut. Cependant on ne peut pas exclure que cette diminution ne soit due à une instabilité de l'ARN polymérase à la suite du recrutement. Le deuxième effet

est d'empêcher la dissociation de Rrn3 de l'ARN polymérase I en élongation. Cet effet est corrélé avec une forte sensibilité au mycophénolate. Ces phénotypes ne sont pas supprimés par *rpa43-35*,326. Le premier effet cité plus haut suggère que Rpa49 est important pour le recrutement de l'ARN polymérase I. Pour expliquer ce rôle nous proposons deux interprétations : (1) soit Rpa49 stimule l'interaction entre l'ARN polymérase I et Rrn3, (2) soit elle stimule l'interaction entre Rrn3 et le Core Factor (Figure 29). Afin de tester ces deux hypothèses il serait intéressant de purifier l'ARN polymérase I à partir d'une souche *rpa49Δ Rpa190 ::HA* et d'examiner la co-purification de Rrn3. Si la quantité de Rrn3 co-purifiée est alors diminuée dans *rpa49Δ* alors Rpa49 stimule l'interaction entre Rrn3 et l'ARN polymérase I. On pourrait également tester la deuxième hypothèse en purifiant le Core Factor pour analyser sa co-purification de l'ARN polymérase I.

Le deuxième effet, qui empêche la dissociation de Rrn3 de polymérase I, est corrélé à des défauts d'élongation qui se manifestent par une sensibilité au mycophénolate (avec une forte dissociation de l'ARN polymérase I) ou encore par une létalité dans des contextes où la topologie de l'ADN (*top1Δ*, *hmo1Δ*) ou l'étape d'élongation (*rpa135-L656P*) pourraient être affectés. Notre hypothèse est que le défaut de dissociation de Rrn3 est la cause du défaut d'élongation, mais nous n'avons pas de preuves expérimentales. On pourrait tirer parti des doubles mutants *rpa49Δ top1Δ*, *rpa49Δ hmo1Δ*, ou *rpa49Δ rpa135-L656P* afin de rechercher des supprimeurs extragéniques de leur létalité. Le premier intérêt de ces supprimeurs serait de savoir si l'on peut séparer le défaut de dissociation de Rrn3 du défaut d'élongation observé dans *rpa49Δ*. Ils permettraient de mettre également le doigt sur de nouveaux acteurs qui interviennent dans l'étape d'élongation par l'ARN polymérase I et/ou dans l'étape de dissociation de Rrn3.

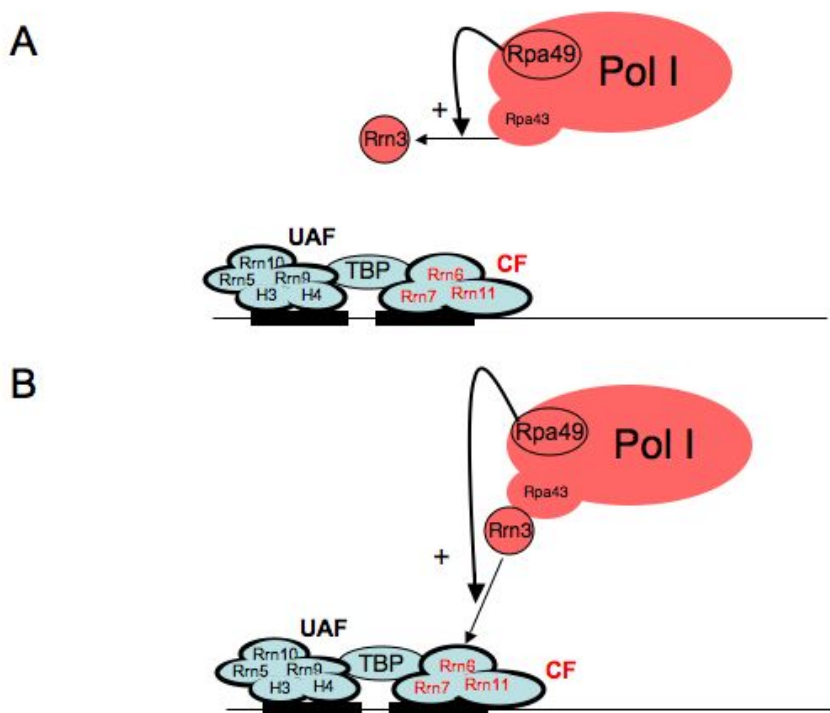


Figure 29 : Deux modèles pour expliquer le rôle de Rpa49 dans le recrutement de l'ARN polymérase I. (A) Rpa49 stimule l'interaction entre Rrn3 et Rpa43. **(B)** Rpa49 stimule l'interaction entre Rrn3 et Rrn6 (Core Factor).

Rpa49 et Rpa34 sont-ils requis pour le couplage transcription maturation de ARN 35S ?

Comme décrit dans le chapitre II de ce manuscrit, il semblerait que la synthèse du précurseur du pré-ARN soit couplée à sa propre maturation. En effet l'équipe de S. Baserga a montré que la déplétion des t-Utps conduit à une chute de la transcription du pré-ARNr (Gallagher et al. 2004). A l'inverse, l'équipe de Nomura a observé qu'un mutant *rpa135-D784G* portant des défauts d'élongation *in vivo* et *in vitro* a également des défauts de maturation du pré-ARN et des défauts d'assemblage des ribosomes (Schneider et al. 2007). Compte-tenu du fait que les mutants *rpa49* sont affectés dans l'élongation par l'ARN polymérase I, il serait intéressant de savoir si ces mutants ont un défaut de maturation du précurseur des ARNr. Une analyse par la microscopie électronique des arbres de Noël permettrait également d'analyser le couplage transcription/maturation des ARNr dans ce mutant.

Par ailleurs, Rpa34 interagit en double-hybride avec les protéines Nop56 et Nop58 (associées au processome) qui prend en charge l'ARN 35S naissant (Gautier et al. 1997; Dragon et al. 2002). Il y a une autre interaction double-hybride entre Rpa34 et Gno1, une protéine qui intervient dans les premières étapes de maturation de l'ARNr (Guglielmi and Werner 2002). Il est donc possible que le dimère Rpa34-Rpa49 joue un rôle dans le recrutement de la machinerie de la maturation de l'ARNr 35S, ce qui pourrait être révélé par le profil d'occupation sur l'ADNr de Nop56, Nop58 et Gno1 dans les mutants *rpa34Δ* et *rpa49*.

Quel est le sens entre de l'interaction entre Top1 et Rpa49/Rpa34 ?

Nos données génétiques montrent qu'en l'absence de Top1, l'hétérodimère Rpa49-Rpa34 devient indispensable à l'ARN polymérase I. On sait que *top1Δ* désorganise la chromatine (Cavalli et al. 1996). Des données préliminaires obtenues lors de cette thèse suggèrent également que *top1Δ* modifie la distribution de l'ARN polymérase I sur l'ADNr (Figure 30). En effet, en l'absence de Top1, l'ARN polymérase I semble s'accumuler au début de la région codante de l'ADNr. Cela suggère que *top1Δ* inhibe la progression de l'ARN polymérase I le long du ADNr.

Le fait que le double mutant *top1Δ rpa49Δ* soit létal suggère que l'hétérodimère Rpa49-Rpa34 optimise la translocation de l'enzyme lorsque la topologie de l'ADN est désorganisée. Cet effet passerait peut être par une interaction directe de Top1 avec Rpa34, car ces deux protéines interagissent en double hybride. A la vue de ces interactions, plusieurs expériences sont envisageables pour comprendre l'interaction entre Top1 et le dimère Rpa49-Rpa34. Dans un premier temps il serait intéressant de vérifier si l'on peut co-immunopurifier Top1 avec l'ARN polymérase I. Si cette co-immunopurification s'avère possible on pourra vérifier l'influence de la délétion de *RPA34* sur co-immunopurification entre Top1 et l'ARN polymérase I.

Si l'hétérodimère Rpa49-Rpa34 est un point d'ancrage de Top1 sur l'ARN polymérase I, on s'attend aussi à ce que la délétion de *RPA34* ou *RPA49* modifie l'occupation de Top1 sur l'ADNr. On pourrait donc également étudier l'occupation de Top1 sur l'ADNr par immuno-précipitation de la chromatine et l'influence de la délétion de *RPA34* ou de *RPA49* sur cette distribution.

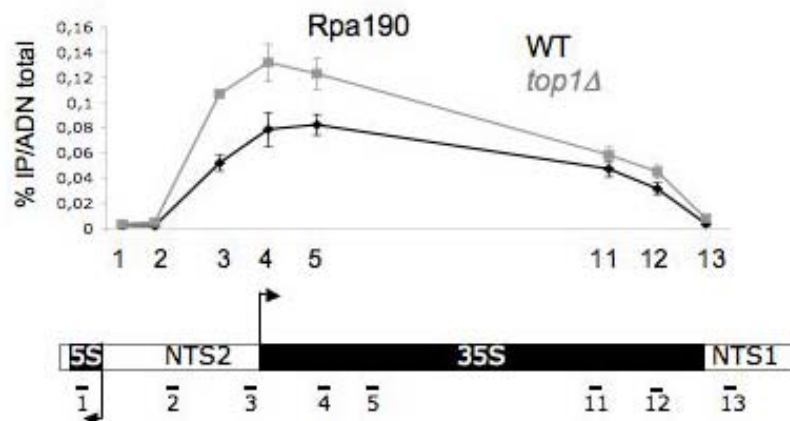


Figure 30 : Etude par immuno-précipitation de la chromatine de l'effet de la délétion de Top1 sur la distribution de l'ARN polymérase I (représentée par Rpa190).

Un TCR associé à l'ARN polymérase I ?

Chez la levure, plusieurs données expérimentales indiquent que le TCR (Transcription Coupled Repair) pourrait s'étendre à la transcription de l'ADNr (Conconi et al. 2002; den Dulk et al. 2005). Daphné Despres (Thèse 2006) a observé que le mutant *rpa49Δ* présente une forte sensibilité aux UVs dans un contexte *rad7Δ* inactivé pour la Réparation Globale du Génome (GGR), ce qui suggère fortement un défaut TCR.

Compte-tenu de ce phénotype il faudrait dans un premier temps examiner si *rpa49Δ* possède un défaut TCR en mesurant la cinétique de réparation des dimères de thymides sur le brin transcrit de l'ADNr du mutant *rpa49Δ*. Sachant que chez l'ARN polymérase II, les mutants *rpb4Δ*, *rpb9Δ* et *rpb7-G98A* présentent des défauts de TCR (Li and Smerdon 2002) et nos résultats voir Annexe II). Il serait intéressant d'étendre cette étude aux mutants correspondant aux sous-unités paralogues de l'ARN polymérase I c'est-à-dire à *rpa14Δ*, *rpa12Δ* et aux mutants de Rpa43.

Enfin nous avons vu dans l'introduction que CSB/Rad26 et TFIIH pourraient participer dans la transcription de l'ADNr par l'ARN polymérase I humaine. Néanmoins, nos expériences d'immuno-précipitation de la chromatine ne révèlent pas la présence de ces protéines sur l'ADNr de *S. cerevisiae* en condition normale de croissance. Il serait donc intéressant d'analyser leur occupation sur l'ADNr à la suite d'une exposition aux UV. Il se

peut en effet que ces facteurs soient spécifiquement recrutés à la suite de dommages de l'ADN.

Quel est le rôle des deux domaines conservés de Rpa43 ?

Rpa43 est composée d'un domaine central très conservé et bipartite, avec un domaine Rpb7 et un domaine Pol I spécifique. Nos données et celles de G. Peyroche *et al.* (2000) révèlent que la partie conservée de Rpa43 est indispensable à sa fonction, alors que la délétion des domaines N et C-terminaux est sans effet sur la croissance (Peyroche et al. 2000). Il est probable que l'interaction entre Rpa43 et Rrn3 soit affectée dans ces mutants. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser une mutagenèse dirigée sur Rpa43 (en s'aidant de la modélisation de Rpa43/Rpa14) et d'analyser l'interaction *in vitro*, par co-immuno-précipitation de formes recombinantes de Rrn3 et des mutants Rpa43 co-exprimées chez *E. coli*. Nous prédisons que les mutants du domaine Pol I spécifique seront critiques pour l'interaction avec Rrn3, mais pas ceux du domaine Rpb7 like. Le domaine Rpb7 qui est conservé à travers les trois polymérases pourrait en revanche être important pour l'ouverture du promoteur après le recrutement de l'ARN polymérase I.

Spt5/Spt6 sont ils impliqués dans la transcription de l'ADNr ?

Des données de la littérature suggèrent que les facteurs d'élongation Spt5, Spt6 pourraient intervenir dans la transcription par l'ARN polymérase I (Lindstrom et al. 2003; Schneider et al. 2006). De plus, Gérard Peyroche (Thèse 2003) a également observé que Rpa43 interagit en double-hybride avec Spt5 et Spt6.

Au début de ma thèse, il a été décidé d'investiguer le rôle de ces protéines dans la transcription par l'ARN polymérase I. J'ai montré que le domaine conservé de Rpa43 est requis dans ces interactions. Par ailleurs, nous avons observé qu'il y a une fraction minoritaire de Spt6 et de Spt5 dans le nucléole. Finalement, le mutant *spt6-14* présente un effet synthétique avec l'allèle *rpa43-chim2*. Pour valider le rôle de Spt5 et Spt6 dans la transcription par l'ARN polymérase I, j'ai étudié la présence de ces protéines sur l'ADNr en utilisant la technique d'immuno-précipitation de la chromatine. Cependant, je n'ai pas révélé la présence de ces protéines sur l'ADNr alors qu'elles sont détectables sur des gènes transcrits par l'ARN polymérase II. Il se peut que ces protéines soient en trop faible quantité sur l'ADNr pour être observables ou encore qu'elles soient recrutées sur l'ADNr dans des

conditions particulières (en présence d'inhibiteur d'élongation). Par ailleurs, il n'est pas exclu que l'interaction observée entre Rpa43 et Spt5/Spt6 ne soit un artéfact mimant l'interaction réelle entre ces facteurs et la sous-unité Rpb7 de l'ARN polymérase II.

Il se pourrait que les facteurs Spt5/Spt6 soient importants pour faire passer l'ARN polymérase I dans une conformation compétente pour l'élongation de la transcription. On peut imaginer un modèle suivant : une fois que l'ARN polymérase I est recrutée sur le complexe de pré-initiation, les protéines Spt5/Spt6 pourrait « chasser » Rrn3 de la tige Rpa43/Rpa14 et prendre la place de cette dernière pour que l'ARN polymérase I progresse sur l'ADN. Dans ce modèle, la sous-unité Rpa43 serait impliquée successivement dans les processus d'initiation (en permettant l'interaction de l'ARN polymérase I avec Rrn3) et d'élongation de la transcription (en contactant Spt5/Spt6). Il serait alors intéressant de déterminer si ces interactions sont exclusives, et si le contact de Rpa43 avec Spt5/Spt6 dissocie le complexe ARN polymérase I/Rrn3.

Compte tenu des fortes conservations qu'il y a entre les ARN polymérases, il ne serait pas invraisemblable que d'autres facteurs de transcription de l'ARN polymérase II soient également impliqués dans la transcription par l'ARN polymérase I. Une analyse de l'occupation des facteurs d'élongation par l'ARN polymérase II sur l'ADNr permettrait de clarifier ce point. Trois facteurs sont particulièrement intéressants de ce point de vue : TFIIS, Spt16 et Spt4. De récentes données de Maxime Wéry (communication personnelle) montrent que TFIIS est présent en faible proportion sur le locus ADNr à la suite d'une exposition des cellules au mycophénolate. D'après l'équipe de Joost Zomerdijs (communication personnelle), le facteur FACT humain (Spt16/Pob3) est présent sur l'ADNr et il stimule la transcription par l'ARN polymérase I. Quant au facteur Spt4, comme TFIIS, il est également présent chez les archées et il ne serait pas surprenant que les trois systèmes de transcription eucaryotiques aient conservé l'utilisation de ces facteurs.

Quelles sont les interactions fonctionnelles entre Rpa49/Rpa34 et Rpa12 ?

Rpa49 et Rpa34 pourraient être des partenaires fonctionnels de la sous-unité Rpa12. En effet, d'après les résultats de Gadgil *et al.* (1997) le triple mutant *rpa12Δ rpa34Δ rpa49Δ* n'aggrave pas le phénotype de croissance du simple mutant *rpa49Δ* (Gadgil *et al.* 1997). De plus, l'invalidation de Rpa12 conduit à la dissociation de Rpa49 de la polymérase (Van Mullem *et al.* 2002). Enfin, Khun *et al.* montrent que le dimère Rpa49/Rpa34 se positionne près de Rpa12 dans la structure de l'ARN polymérase I (communication

personnelle). Rpa12 est impliquée dans l'étape de terminaison (Prescott et al. 2004). Il serait donc intéressant d'étudier de plus près le rôle que pourrait avoir le dimère Rpa49/Rpa34 dans cette étape de la transcription et réciproquement d'étudier l'influence de *rpa12Δ* sur le recrutement de Rrn3.

MATERIELS ET METHODES

I MATERIELS

1. Milieux de cultures

- YPD (*Yeast, Peptone, Dextrose*):

Glucose 20 g/l, Peptone 20 g/l et Yeast Extract 10 g/l

- *Minimum SD (Synthétique Dextrose)* :

Yeast Nitrogen Base 1,7g/l, Sulfate d'ammonium 5 g/l et Glucose 20 g/l

Ce milieu peut être supplémenté avec différents acides aminés (L-Histidine 10 mg/l, L-Lysine 10 mg/l, L-Leucine 60 mg/L, L-Tryptophane 40 mg/l) et bases azotées (adénine, uracile 20 mg/l) en fonction des auxotrophies des souches utilisées.

- *Milieu SC (Synthétique Complet) et milieux d'omission* :

D-glucose 20 g/l, YNB 6,7 g/l et CSM (Complete Supplement Mixture) approprié.

Le CSM est un mélange d'acides aminés et de deux bases nucléiques (adénine et uracile), sans un métabolite choisi.

Peuvent être ajoutés au milieu SC les composants suivants :

- Mycophénolate (MPA) à des concentrations de 0, 5, 10, 30, et 60 µg/ml, à partir d'une solution mère (dans la solution mère le mycophénolate est repris dans du méthanol).
- 6-azauracile (6-AU) à des concentrations de 0, 10, 50 et 200 µg/ml

Milieu semi-défini CASA :

Milieu SD additionné de 'casaminoacid' (hydrolysate de caséine) 2 g/l, qui contient tous les acides aminés usuels à l'exception du tryptophane, de la méthionine et de la tyrosine. Ce milieu forme la base de :

CAU (Casa + adénine + uracile)

CAW (Casa + adénine + tryptophane)

CUW (Casa + uracile + tryptophane)

Permettant de tester les auxotrophies en tryptophane, uracile ou adénine.

5-Fluoro-orotate (5-FOA) :

CASA , agar 30 g/l , adénine, uracile et tryptophane à 20 mg/l chacun, 5-FOA 1 g/l.

Milieu de sporulation (SPO) :

Acétate de potassium 10 g/l, avec adénine, uracile, lysine, leucine, histidine, tryptophane dilués cinq fois par rapport aux milieux de croissance.

Remarque : tous les milieux solides contiennent de l'agar à 20 g/l.

2. Souches et plasmides**Souches**

Souche	Génotype	Origine/Parents
49::HIS3	<i>MATa rpa49Δ::HIS3 ura3-52 his3Δ200 trp1Δ1 lys2-801 ade2-1</i>	(1)
49-ΔA	<i>MATa rpa49Δ::TRP1 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ1 lys2-801 ade2-1</i>	(1)
A14::URA3	<i>MATa ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 rpa14Δ::URA3 his3Δ200 leu2Δ1</i>	(2)
D101-H3	<i>MATarpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 (3)
D101-I2	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 (3)
D121-9C	<i>MATa ura3-1 trp1-1 his3 leu2-3,112 ade2-1 rpa12Δ::LEU2 rpa34Δ::HIS3</i>	(4)
D123-12B	<i>MATa ura3 trp1 his3-11 lys2-801 leu2-3,112 ade2-1 rpa49Δ::TRP1</i>	(4)
D126-7A	<i>MATa ura3 trp1 his3 leu2-3,112 ade2-1 lys2-801 rpa14Δ::URA3</i>	A14::URA3, D121-9C
D360-1A	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rpa14Δ::HIS3</i>	(4)
D567-11B	<i>MATa leu2 ura3-52 trp1 rrn3-8 lys2-801</i>	SL9-2C , YCC95
D567-3C	<i>MATa ura3-52 trp1 leu2 rrn3-8</i>	SL9-2C , YCC95
D574-1B	<i>MATa ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 ade2-1 rpa49Δ::TRP1 RRN9::HA-KanMX4</i>	Rrn9-HA , D123-12B
D612-5A	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1 rpa49Δ::HIS3 rrn3::3HA::TRP1(Sp)</i>	YMR9, SL110-5B
D648-2A	<i>MATa leu2Δ1 his3Δ200 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1 rpa34Δ::HIS3 rrn3::3HA::TRP1(Sp)</i>	YMR9, T4-1C
D683-5A	<i>MATa ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 top1D::LEU2 rpa49D::KanMX4 // PFB74 (2mURA3 RPA49)</i>	Y01196, W500-1D
D684-2B	<i>MATa ade2 ura3 lys2 trp1 his3 leu2 hmo1D::HIS3 rpa49::KanMX4 // PFB74 (2m URA3 RPA49)</i>	Y01196, SL16-2C
D699-13C	<i>MATa ade2 ura3 lys2 trp1 his3 leu2 rpa14D::HIS3 rpa49::KanMX4 // PFB74 (2m URA3 RPA49)</i>	Y01196, D360-1A
D710-8A	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3 leu2 rpa49::KanMX4 // YCPA43 CEN URA3 RPA43)</i>	D101-H3, Y01196
D716-9A	<i>MATa trp1 leu2 ura3 rrn3-8 rpa49D::KanMX4 // PFB74 (2mURA3 RPA49)</i>	Y01196, D567-11B
GPy21	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 rrn3-8 ura3-52 trp1 leu2 his3Δ200</i>	(5)

	<i>his7-2 ade5 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	
OG13-1A	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ1 lys2-801 ade2-1 rpa34Δ::URA3</i>	(4)
Rrn3-HA	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn3::HA::KanMX4</i>	YPH499
Rrn7-HA	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn7::HA::KanMX4</i>	YPH499
Rrn9-HA	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn9::HA::KanMX4</i>	YPH499
SL103-2A	<i>MATa rpa34Δ::HIS3 ura3-52 ade2-1 lys2-801 trp1 his3Δ200 RRN9::HA-KanMX4</i>	RRN9-HA , T4-1D
SL104-2C	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1 his3Δ200 rrn7::HA3::KanMX4 rpa34::HIS3</i>	RRN7-HA , T4-1D
SL105-7A	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn7::HA3::KanMX4 rpa43Δ::LEU2 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2 , RRN7-HA
SL106-7A	<i>MATa ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 RRN9::HA-KanMX4 rpa43Δ::LEU2 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2, RRN9-HA
SL111-4A	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1 lys2-801 ade2-1 leu2Δ1 rrn7::HA3::KanMX4 rpa49Δ::TRP1</i>	RRN7-HA, 49-DA
SL112-1C	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1 lys2-801 ade2-1 rrn3::HA::KanMX4 rpa49Δ::TRP1</i>	SL97-17C , 49-DA
SL16-2C	<i>MATa ade2 ura3-52 lys2-801 his3-D200 leu2-D1 hmo1D::HIS3</i>	(11)
SL27-2B	<i>MATa ade2-1 ura3 lys2-801 trp1 his3Δ200 leu2Δ1 rpa43Δ::LEU2 rpa34Δ::HIS3// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	T4-1C , D101-H3
SL29-3C	<i>MATa ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rpa43Δ::LEU2 rpa14Δ::HIS3 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101-I2 , D360-1A
SL30-2C	<i>MATa rpa49::HIS3 rpa43Δ::LEU2 ura3-52 lys2-801 his3Δ200 leu2Δ1 ade2 trp1// YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	49::HIS3 , D101-H3
SL97-17C	<i>MATa rpa43Δ::LEU2 ade2-1 ura3-52 lys2-801 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn3::HA::KanMX4 // YCPA43 (CEN URA3 RPA43)</i>	D101 , RRN3-HA
T4-1C	<i>MATa rpa34Δ::HIS3 ura3-52 ade2-1 lys2-801 his3Δ200 trp1Δ1</i>	(4)
T4-1D	<i>MATa rpa34Δ::HIS3 ura3-52 ade2-1 lys2-801 his3Δ200 trp1Δ1</i>	(4)
W303-1A	<i>MATa ade2-1 can1-100 ura3-1 lys2-801 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112</i>	
W500-1D	<i>MATa ade2-1 can1-100 ura3-1 lys2-801 trp1-1 his3-11,15 leu2-3,112 top1D::LEU2</i>	W303-1A
Y01196	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpa49Δ::kanMX4</i>	Euroscarf*
yBF51	<i>MATa ura3 trp1 his3-11 lys2-801 leu2-3,112 ade2-1 rpa49Δ::TRP1 RPA190::3HA::HIS3</i>	D123-12B
YCC95	<i>MATa ura3-52 ade5 his7-2 trp1-289 leu2-112 rrn3-8</i>	(6)
YMR9	<i>MATa ade2-1 lys2-801 ura3-52 trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1 rrn3::HA3::TRP1(Sp)</i>	YPH499
YPH500	<i>MATa ura3-52 ade2-1 lys2-801 his3Δ200 trp1Δ63 leu2Δ</i>	(7)

* <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>

Plasmides

Plasmide	Gène de levure	Vecteur d'origine
pGBT9-RPA34	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::RPA34</i>	pVV212*
pFB44	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-chim1</i>	pVV212
pFB45	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-chim2</i>	pVV212
pFB46	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-35,281</i>	pVV212
pFB48	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-1,235</i>	pVV212
pFB49	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-1,265</i>	pVV212
pFB490	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-35,326</i>	pVV212
pFB491	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::rpa43-1,281</i>	pVV212
pFB492	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::RPA49</i>	pVV213**
pFB493	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::rpa49-63,416</i>	pVV213
pFB494	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::rpa49-89,416</i>	pVV213
pFB495	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::rpa49-119,416</i>	pVV213
pFB496	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::rpa49-1,260</i>	pVV213
pFB497	<i>LEU2 GAL4AD(768-881)::rpa49-1,366</i>	pVV213
pFB61	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,281</i>	pVV200 (8)
pFB62	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,265</i>	pVV200
pFB63	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,326</i>	pVV200
pFB64	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,235</i>	pVV200
pFB65	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,235</i>	pVV200
pFB66	<i>TRP1 pPGK::rpa43-35,281</i>	pVV200
pFB67	<i>TRP1 pPGK::rpa43-1,216</i>	pVV200
pFB74	<i>URA3 pPGK::RPA49</i>	pVV214 (8)
pFB75	<i>URA3 pPGK::rpa49-1,366</i>	pVV214
pFB76	<i>URA3 pPGK::rpa49-1,260</i>	pVV214
pFB77	<i>URA3 pPGK::rpa49-63,416</i>	pVV214
pFB78	<i>URA3 pPGK::rpa49-89,416</i>	pVV214
pFB79	<i>URA3 pPGK::rpa49-119,416</i>	pVV214
pGA43-chim1	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim1</i>	pGEN (7)
pGA43-chim2	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim2</i>	pGEN
pGA43-chim4	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim4</i>	pGEN
pGA43-chim7	<i>TRP1 pPGK::rpa43-chim7</i>	pGEN
pGEN-RPA43	<i>TRP1 pPGK::RPA43</i>	pGEN
pGP13	<i>LEU2 GAL4AD(1-147)::RPA14</i>	pACT2 (9)
pGP9	<i>TRP1 GAL4BD(1-147)::RPA43</i>	pGBT9 (9)
pSLA34	<i>URA3 RPA34</i>	pFL44L (10)
pVV200-a49	<i>TRP1 pPGK::RPA49</i>	pVV200
pVV200-a49ΔN119	<i>TRP1 pPGK::rpa49-119,416</i>	pVV200
pVV200-a49ΔC156	<i>TRP1 pPGK::rpa49-1,260</i>	pVV200
pVV200-a49ΔC45	<i>TRP1 pPGK::rpa49-1,366</i>	pVV200
pVV200-a49ΔN63	<i>TRP1 pPGK::rpa49-63,416</i>	pVV200
pVV200-a49ΔN89	<i>TRP1 pPGK::rpa49-89,416</i>	pVV200

- * Version Gateway® de pGBT9, V. Van Mullem & M. Wéry, communication personnelle.
- ** Version Gateway® de pACT2, V. Van Mullem & M. Wéry, communication personnelle.

1. Liljelund, P., Mariotte, M., Buhler, J. M. & Sentenac, A. (1992) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 9302-9305.
2. Smid, A., Riva, M., Bouet, F., Sentenac, A. & Carles, C. (1995) *Journal of Biological Chemistry* 270, 13544-13540.
3. Thuriaux, P., Mariotte, S., Buhler, J. M., Sentenac, A., Vu, L., Lee, B. S. & Nomura, M. (1995) *Journal of Biological Chemistry* 270, 24252-24257.
4. Gadal, O., Chédin, S., Quémeneur, E., Carles, C., Sentenac, A. & Thuriaux, P. (1997) *Molecular and Cellular Biology* 17, 1787-1795.
5. Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. & Riva, M. (2000) *EMBO Journal* 19, 5473-82.
6. Cadwell, C., Yoon, H. Y., Zebarjadian, Y. & Carbon, J. (1997) *Molecular and Cellular Biology* 17, 6175-6183.
7. Shpakovski, G. V., Acker, J., Wintzerith, M., Lacroix, J. F., Thuriaux, P. & Vigneron, M. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 4702-4710.
8. Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X. & Vandenhaute, J. (2003) *Yeast* 20, 739-46.
9. Flores, A., Briand, J. F., Boschiero, C., Gadal, O., Andrau, J. C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A. & Werner, M. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 7815-7820.
10. Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L. & Lacroute, F. (1991) *Yeast* 7, 609-615.
11. Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C. and Thuriaux, P. (2002) Hmo1, an HMG-Box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *EMBO J.*, 21, 5498-5507.

II METHODES EXPERIMENTALES

1. Immuno-précipitation chromatinienne

L'immuno-précipitation chromatinienne (ChIP) est une technique qui permet d'apprécier l'enrichissement d'une protéine sur l'ADN. Dans un premier temps les protéines sont pontées à l'ADN grâce à de la formaldéhyde puis la chromatine est extraite et cassée par sonication en fragments d'environ 500 pb. Une immuno-précipitation de la protéine d'intérêt pontée à la chromatine est ensuite réalisée par un anticorps dirigé soit contre la protéine native, soit contre une étiquette fusionnée à cette protéine. Suite à l'élution de la chromatine immunoprécipité le pontage est aboli par digestion des protéines à la Pronase puis par un passage à 65°C. Des PCR en temps réel sont ensuite réalisées sur l'ADN afin de calculer le niveau d'occupation de la protéine d'intérêt.

Pontage covalent in vivo

Les souches sont ensemencées dans 100 ml de milieu de culture et incubées la nuit à 30°C jusqu'à DO₆₀₀ 0,6. Le pontage est réalisé par addition de formaldéhyde à concentration finale de 1%. Après incubation à 25°C le pontage est arrêté par ajout de 20 ml de glycine à 2,5 M. Les cellules sont soumises à une agitation à 25°C pendant 5 min puis récoltées par centrifugation (3 min à 4000 rpm) dans des Falcons de 50 ml (température ambiante, rotor A-4-62, Eppendorf). Les culots cellulaires sont lavés dans 50 ml de Tris 20 mM pH 8 froid puis sont centrifugés 3 minutes à 4000 rpm. Les culots sont ensuite congelés à -80°C.

Extraction

Après décongélation, les cellules sont reprises dans 5 ml de tampon de lyse *FA/SDS/PMSF* (50 mM Hepes-KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton 100X, 0, 1% Déoxycholate de sodium, 0,1% SDS conservé à 4°C, PMSF ajouté extemporanément à concentration finale de 1 mM) puis centrifugées 3 min à 4000 rpm. Les culots sont resuspendus dans 1 ml de tampon de lyse *FA/SDS/PMSF* puis transvasés par 500 µl dans 2 tubes Eppendorfs de 2 ml. 500 µl de billes en verre (425-600 µm) sont ensuite ajoutés et les cellules sont broyées dans l'appareil Vibrax à 4°C à puissance maximale. Pendant le broyage, des tubes Greiner de 12 ml sont percés avec une aiguille (0,7 X 30 nm ou 0,5 X 15 nm). Les tubes sont ensuite placés dans des Falcons de 50 ml froids à l'aide d'anneaux de midiprep. Une fois le broyage terminé les échantillons sont transvasés dans les tubes Greiner percés. Les tubes contenant le broyat sont lavés avec 1 ml de tampon de lyse *FA/SDS/PMSF* froid. Les broyats sont isolés des billes par centrifugation de 1 minute à 2000 rpm (température ambiante, rotor A-4-62, Eppendorf). Les éluats sont ensuite transférés dans des tubes Corex 15 ml stériles froids puis sont centrifugés à 12000 rpm à 4°C (rotor JA-17) pendant 20 min. Les surnageants sont aspirés à la trompe à vide. Chaque culot est dissous dans 1,6 ml de tampon de lyse *FA/SDS/PMSF* et transvasé dans un tube Eppendorf de 2 ml. Ce dernier est ensuite mis sur roue rotative à 4°C pendant une 1 heure. Une centrifugation à 15 000 rpm (rotor Sigma 12148-H) est ensuite réalisée pour récolter les culots. Les surnageants sont aspirés et les culots sont remis en suspension dans 1,6 ml de tampon de lyse *FA/DS/PMSF*. Une incubation des échantillons sur roue rotative à 4°C est réalisée pendant 15 min.

Sonication de la chromatine

Les tubes sont placés dans un mélange eau/glace. La sonde du sonicateur est placée à 3-4 mm du fond des tubes. Chaque échantillon est soniqué 3 fois pendant 40 secondes à puissance 4, 60% *duty cycle* et mode *pulsed* (Sonicateur Cell™, Sonics & Materiels INC INC, Danbury, Connecticut, USA), avec 20 secondes d'intervalle entre deux sonications, pour générer des fragments d'ADN d'une longueur moyenne de 500 pb. Le mélange est ensuite transféré dans un tube Greiner de 12 ml. 3 ml de tampon de lyse *FA/SDS/PMSF* sont ajoutés à chaque échantillon et les tubes sont ensuite placés sur roue rotative à 4°C pendant 30 min. Une centrifugation à 10000 rpm (rotor JA-17) pendant 30 min est ensuite réalisée pour rendre

soluble la chromatine. La chromatine est aliquotée par 700 µl et congelée à l'azote pour être placée au -80°C.

Préparation de la chromatine pour tester la qualité de la sonication

Une digestion des protéines par de la pronase de 350 µl de chromatine est réalisée 1h à 37°C par de la pronase (12,5 µl de Pronase à 20 mg/ml). La réversion du pontage ADN-protéine est ensuite obtenue en incubant les échantillons toute la nuit à 65°C. Les extraits sont ensuite incubés 1h à 37°C avec 1,2 µl de Rnase A (6 mg/ml) afin d'éliminer les ARN. Les fragments d'ADN sont ensuite purifiés avec le Kit PCR purification de Quiagen. L'élution se fait dans 100 µl de Tris 10 mM pH 8. 20 µl de chaque purification sont déposés sur Gel d'agorose 0,7% TAE afin de vérifier la taille des fragments obtenus après sonication.

Immuno-précipitation

50 µl de billes magnétiques couplées à des anticorps (anti-souris ou anti-lapin) sont lavées 3 fois avec 500 µl de PBS/BSA 0,1%, puis sont repris dans 100 µl. L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté aux billes afin d'être couplé à l'anticorps primaire couplé aux billes. Ce couplage se fait pendant une incubation à 30°C pendant 30 minutes dans l'agitateur Eppendorf sous agitation de 1300 rpm. Suite à cette incubation trois lavages dans 500 µl de PBS/BSA 0,1% sont réalisés. Le dernier lavage se fait 10 minutes à 30°C sous agitation de 1300 rpm. 500 µl de chromatine et 50 µl de PBS BSA (10 mg/ml) sont ensuite ajoutés aux billes, puis les mélanges sont incubés à 21°C pendant 2 heures sous agitation à 1300 rpm. Les billes sont ensuite reprises dans 500 µl de tampon de lyse *FA/SDS/PMSF* et transférées dans un tube propre. Trois lavages sont effectués avec 1 ml de tampon de lyse dont la concentration en NaCl est ajustée à 500 mM. Le dernier lavage se fait à 21°C pendant 20 min sous agitation à 1300 rpm. Les échantillons sont ensuite lavés dans 500 µl de tampon IP (10 mM Tris pH 8, 250mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP40, 0,5% Déoxycholate de sodium) puis dans 500 µl de TE. Les billes sont ensuite remises en suspension dans 125 µl de tampon pronase dilué 5 fois (25 mM TRIS pH 7,5, 25 mM EDTA, 2,5% SDS) pour élution des protéines pendant à 65°C pendant 20 minutes. Afin d'hydrolyser les protéines 6,25 µl de Pronase (20 mg/ ml) sont ajoutés à l'éluat. 6,25 µl de Pronase (20 mg/ ml) et 25 µl de tampon Pronase (125 mM TRIS pH 7,5, 25 mM EDTA, 2,5% SDS) sont également ajoutés à 100 µl d'extrait brut (Input).

Réversion du pontage ADN-protéines

Après 1h à 37°C, la réversion du pontage ADN-protéine est obtenue en incubant toute la nuit à 65°C. Les extraits sont ensuite incubés 1h à 37°C avec 1,2 µl de Rnase A (6 mg/ml) afin d'éliminer les ARN. Les fragments d'ADN sont ensuite purifiés avec le Kit PCR purification de Quiagen. L'élution se fait dans 100 µl de Tris 10 mM pH 8. Une seconde élution est ensuite réalisée dans 100 µl de Tris.

PCR en temps réel

Les fragments d'ADN co-immunoprécipités sont détectés par PCR quantitative en temps réel. Les réactions sont effectuées dans les plaques 96 puits (Thermo-Fast® 96 Reaction, Abgene) en utilisant SYBR Green Master Mix (Invitrogen) et le programme 35 X 15 secondes à 95°C, 1 min à 60°C sur un appareil ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Chaque PCR est réalisée en duplicat dans un volume final de 25 µl à partir de 5 µl d'ADN purifiés (IP ou Input) et 10 pmoles de chaque amorce. Une courbe de dissociation des amplicons est déterminée par augmentation progressive de la température en fin de réaction afin de vérifier la spécificité de chaque amplicon. Afin de calculer l'enrichissement de la protéine d'intérêt, une valeur seuil Tc (Threshold cycle) est d'abord déterminée pour chaque PCR. Cette valeur correspond au cycle au cours duquel le signal de fluorescence émanant d'un puits atteint un niveau 10 fois supérieur au signal moyen du bruit de fond mesuré pour l'ensemble des puits. En se référant à une courbe standard réalisée sur des dilutions sérielles d'ADN une quantité relative d'ADN est attribuée à chaque cycle. L'enrichissement d'une protéine correspond donc au pourcentage de la quantité d'ADN co-immunoprécipité (IP) par rapport à la quantité d'extrait brut (Input).

2. Clonage Gateway™

La technique « Gateway™ » se base sur la recombinaison du phage Lambda dans le génome d'*E. coli* (Cassuto et al. 1971; Van Mullem et al. 2003). La réaction d'intégration se fait entre le site attP situé dans l'ADN du phage et le site attB localisé dans le génome bactérien. Elle fait appel à deux enzymes: l'intégrase du phage et une protéine bactérienne IHF (Integration Host Factor). Cette réaction d'intégration est réversible. En effet, le phage peut exciser son ADN de celui d'*E. coli*, par recombinaison entre les sites attL et attR. L'excision requiert l'intégrase, la IHF et une autre enzyme phagique, l'excisionase (Xis). Dans le système " Gateway™ ", ces enzymes ont été purifiées pour permettre la réalisation de ces réactions *in vitro*. Les sites att ont été modifiés et dupliqués créant des couples (attB1-attB2, attP1-attP2, attL1-attL2 et attR1-attR2) pour permettre un clonage directionnel des ORFs. (Annexe)

La méthode comporte trois étapes. Premièrement, l'ORF est flanquée de séquences attB1 et attB2 par amplification PCR. Deuxièmement, la réaction BP (pour recombinaison entre les sites attB et attP) permet de cloner l'ORF dans un **vecteur donneur** par recombinaison entre les sites attP1 et attP2 de ce vecteur et les sites attB1 et attB2 bordant l'ORF. Cette réaction est catalysée par un mélange d'intégrase lambda et de protéine IHF purifiées (commercialisé sous le nom de clonase BP). Elle génère un **clone d'entrée** qui contient l'ORF flanquée des sites attL1 et attL2. Finalement, des réactions LR (pour recombinaison entre les sites attL et attR) permettent le transfert de l'ORF du clone d'entrée vers une série de **vecteurs de destination** par recombinaison entre les sites attL1 et attL2 du clone d'entrée et les sites attR1 et attR2 des vecteurs de destination. Ces réactions sont catalysées par la LR clonase (intégrase, IHF et excisionase purifiées) et génèrent des **clones d'expression**. Le vecteur donneur et les vecteurs de destination contiennent entre les sites « att » un gène *ccdB*, dont l'expression est toxique pour la souche d'*E. coli* DH5 α (par interférence avec la gyrase). L'intégration de l'ORF dans ces vecteurs conduit donc à la perte du gène *ccdB*, ce qui fournit un moyen de sélection positive des vecteurs recombinants dans cette souche DH5 α d'*E. coli*.

3. Immuno-précipitation des protéines

Préparation des cellules et préparation des extraits protéiques

Les souches sont ensemencées dans 50 ml de milieu YPD et incubées toute la nuit. A partir de cette préculture, 2 litres de YPD sont ensemencés pour arriver à une DO_{600} de 0,6. Les cellules sont transvasées dans deux flacons de 500 ml puis récoltées par centrifugation pendant 5 minutes à 6000 rpm à 4° (rotor JA-10, Beckman). A partir de cette étape, les cellules sont toujours maintenues à 4°C. Les culots sont ensuite repris dans 4 ml de tampon IP + NP40 0,05% + PMSF 2,5 mM + anti-protéases Complete™ (Roche ; une pastille pour 10 ml de tampon). Les cellules ensuite transférées dans une « chambre » pour presse Eaton refroidie la nuit à -80°C. Les chambres sont placées toute la nuit à -80°C. Les cellules sont ensuite lysées à la presse Eaton en appliquant 6 tonnes/cm². Le lysat est transféré dans un tube pour rotor 50Ti puis centrifugé à 4000 rpm, pendant une heure, à 4°C (rotor 50Ti, Beckman Optima LE-80K Ultracentrifuge). Le surnageant contenant les protéines est transvasé dans des tubes Eppendorfs de 2 ml et ensuite stocké à -80°C.

Préparation des billes

8. 10⁶ billes magnétiques Dynabeads® M450 couvertes d'IgG rat anti-IgG de souris (20 µl à 4.10⁸ billes/ml) sont prélevées pour chaque échantillon. Ces billes sont lavées 2 fois avec 500 µl de PSB/BSA 0,1% puis sont repris dans 100 µl. 1,2 µg d'anticorps 12CA5 purifié (souris anti HA) sont ajoutés à chaque tube. Ces échantillons sont ensuite incubés 30 minutes à 4°C sous agitation de 1300 rpm, puis sont lavés 3 fois dans 500 µl de PBS/BSA 0,1 %, puis deux lavages dans du tampon IP+ NP40 0,05%.

Immuno-précipitation

1,5 mg d'extraits protéiques sont ajoutés à chaque échantillon de billes, puis les mélanges sont incubés 3 heures dans l'agitateur Eppendorf (4°C à 1000 rpm).

Les billes sont reprises dans 500 µl de tampon IP + NP40 0,05% + PMSF 2,5 mM + anti-protéases Complete™ puis sont transférées dans des tubes propres. Quatre lavages dans du tampon IP sont ensuite réalisés. A la suite du dernier lavage, les billes sont reprises dans 16 µl de tampon IP auxquels ajoutés sont 4 µl de tampon de charge concentré 5X (Glycérol 50%, β-mercapto-éthanol 25%, SDS 10%, Tris-HCL 312,5 mM pH 6,8, bleu de bromophénol 0,005%). Les protéines immunoprécipitées sont éluées par chauffage à 95°C pendant 10 minutes. En parallèle, les extraits bruts sont décongelés, puis sont également dénaturés 10

minutes à 95° dans du tampon de chargement. Les éluats sont récupérés et sont conservés à -20°C .

ANNEXE I

Marta KWAPISZ

Frédéric BECKOUËT

Pierre THURIAUX *

Rpb8, a missing link between archaeal, eukaryotic and viral DNA-dependent RNA
polymerases

(LETTER)

CEA, IbiTecS, Service de Biologie Intégrative & Génétique Moléculaire.

Gif/Yvette, F-91191. FRANCE.

* Corresponding author

Tel: +33 1 69 08 35 86

Fax: +33 1 69 08 47 12

E-mail: pierre.thuriaux@cea.fr

KEYWORDS

Archaea / RNA polymerase / Rpb8/ RpoG / Transcription / Yeast

RUNNING HEAD

A conserved RNA polymerase subunit

ABSTRACT

The three DNA-dependent RNA polymerases of Eukaryotes have a conserved twelve-subunit core known to be closely related to archaeal RNA polymerases, except for Rpb8. This polypeptide, one of the five common subunits identical in all three enzymes, was believed so far to be typically eukaryotic, with a related gene product found in at least one type of nucleocytoplasmic DNA virus. We show here that Rpb8 is homologous to RpoG, a polypeptide copurifying with the RNA polymerase of *Sulfolobus acidocaldarius*. RpoG/Rpb8-like polypeptides are present in all Eukaryotes and Crenarchaeota sequenced so far, but are not found in other archaeal lineages or in Bacteria.

Three DNA-dependent RNA polymerases, hereafter called Pol I, II and III, transcribe the nuclear genomes of Eukaryotes. Studies in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* have established that these transcriptionally specialized enzymes share a conserved set of twelve polypeptide. As shown in Table 1, the two largest subunits (Rpb1 and Rpb2) and three small polypeptides (Rpb4, Rpb7, Rpb9) of Pol II are encoded by related but distinct genes in the other two enzymes. However, five small subunits are identical in the three yeast polymerases (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 and Rpb12), and two other (Rpc19, Rpc40) are common to Pol I and III, with Pol II paralogues (Rpb3, Rpb11). This pattern is widely conserved among Eukaryotes, with only minor exceptions known so far (Proshkina et al. 2006).

Bacterial polymerases have a $\beta'\beta\alpha_2\omega$ core structure homologous to five of the eukaryotic core subunits (Table 1), but archaeal polymerases are much more close to the eukaryotic ones, with significant homology to eleven of the twelve core Pol I, II and III subunits (Langer et al. 1995; Werner and Weinzierl 2002; Goede et al. 2006). However, no archaeal gene product related to Rpb8 has been identified so far (Briand et al. 2001; Werner and Weinzierl 2002; Goede et al. 2006). Rpb8 is a common component of the three yeast polymerases (Woychik et

al. 1990; Voutsina et al. 1999; Briand et al. 2001). It is strongly conserved among Eukaryotes and an homologous protein is also encoded by the *Emiliana huxleyi* Virus 86, an algal DNA virus endowed with its own RNA polymerase (Wilson et al. 2005). Using iterative sequence alignments based on the PSI-Blast algorithm (Schaffer et al. 2001), we confirmed the presence of an Rpb8-like protein in all Eukaryotes sequenced so far (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), with no significant homology to any non-eukaryotic genome.

Turning to Archaea, we noticed that a purified RNA polymerase of *Sulfolobus acidocaldarius*, a Crenarchaeon, contains a 121 amino acid polypeptide called RpoG (D. Langer, Ph. D. Thesis 1991, quoted in Langer et al., 1995). However, there is no RpoG-like component in the well-defined euryarchaeal enzymes of *Methanocaldococcus jannaschii* (Werner and Weinzierl 2002) and *Pyrococcus furiosus* (Goede et al. 2006), and it was therefore possible that RpoG may not be a *bona fide* polymerase subunit. PSI-Blast readily identified RpoG-like polypeptides in all crenarchaeal genomes sequenced so far. Intriguingly, this homology search also yielded several gene products that, although well above the threshold value of 0.05, happened to be fungal Rpb8-like polypeptides and included the well-defined Rpb8 subunit of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Voutsina et al. 1999; Shpakovski et al. 2000). Further homology search eventually merged all Rpb8- and RpoG-like gene products into a single protein family, as illustrated by the sequence alignments provided in the Supplementary Material. As indicated in Figure 1, the Rpb8/RpoG protein exists in all Eukaryotes and in all Crenarchaeota sequenced so far (13 genomes), but were not found in Euryarchaeota (47 genomes) or in Nanoarchaeota (1 genome). They were also absent from Bacteria and were only represented in the one viral genome already mentioned.

Some fifteen amino acids are (nearly) invariant in Eukaryotes (Rpb8) and Archaea (RpoG), and their spatial distribution in the yeast Pol II enzyme underscores the similarity of these two proteins. As shown in Figure 2, the ten β sheets of yeast Rpb8 form a compact barrel fold

(Cramer, Bushnell, and Kornberg 2001) where the amino acids shared with RpoG are all closely packed on four β strands ($\beta 4$, $\beta 6$, $\beta 9$ and $\beta 10$). Moreover, Rpb8- $\beta 6$ and Rpb1- $\beta 18$ form a strong β addition motif binding Rpb8 to Rpb1, the largest Pol II subunit. Rpb1- $\beta 18$ corresponds to a $_{563}\text{PAIHKP}_{568}$ motif conserved in the largest subunit of Pol I (Rpa190) and Pol III (Rpc160) of Eukaryotes. Remarkably, this conservation extends to the corresponding RpoA' subunit of Crenarchaeota and to the EHV86 virus, to the exclusion of all other archaeal or viral RNA polymerases, indicating that the Rpb8- $\beta 6$ /Rpb1- $\beta 18$ addition exists in all organism endowed with an Rpb8/RpoG-like polypeptide (the corresponding alignments are shown as Supplementary Material).

These data strongly argue that RpoG and Rpb8 are homologous components of the eukaryotic and archaeal transcription systems, presumably sharing similar functions. The yeast subunit is essential *in vivo* but little is known of its transcriptional role (Woychik et al. 1990; Voutsina et al. 1999; Briand et al. 2001). The role of the archaeal subunit is also quite puzzling given that RpoG-like proteins only exist in Crenarchaeota. Equivalent but structurally unrelated subunits, if they exist in Euryarchaeota, could at best have an accessory role *in vitro* since they are not part of the fully reconstituted RNA polymerase of *M. jannaschii* (Werner and Weinzierl 2002). Crenarchaeota also differ from Euryarchaeota and Nanoarchaeota by usually lacking histones (Reeve 2003; Cubonova et al. 2005), which might call for an additional RNA polymerase subunit like RpoG. However, an histone-encoding gene was recently identified in *Cenarchaeum symbiosum*, a psychrophilic Crenarchaeon (Reeve 2003; Cubonova et al. 2005), and our own Psi-Blast search showed that archaeal histones and RpoG-like proteins co-exist in two other Crenarchaeota, *Thermofilum pendens* and *Caldivirga maquilingensis* (see Figure 1).

The Rpb8/RpoG homology implies that the entire twelve-subunit core structure of Pol I, II and III derives from some archaeal ancestor(s). Nevertheless, all currently sequenced eukaryotic genomes share a large N-terminal fold, present in their Rpb5 subunit but lacking in

its archaeal RpoH homolog. As discussed elsewhere (Zaros et al. 2007), this domain may directly contact the nucleosomes downstream of the elongating RNA polymerase, thus fulfilling a function needed in all three nuclear transcription systems.

We therefore speculate that the ancestor of eukaryotic polymerases existed before the separation of the two main archaeal lineages, and that it was endowed with histones and with an RpoG-like subunit as two contemporary Crenarchaeaota (*T. pendens*, *C. maquilingensis*). The N-terminal fold of Rpb5 then probably appeared in early forms of the nucleus, as an adaptation to nucleosomes, and was followed by the emergence of the three paralogous enzymes now found in all sequenced Eukaryotes (Proshkina et al. 2006).

Acknowledgments. P.T. dedicates this work to the memory of Wolfram Zillig, in remembrance of a great scientist and of a good friend. M.K. and F.B. were supported by the Fondation pour la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche sur le Cancer.

FIGURES

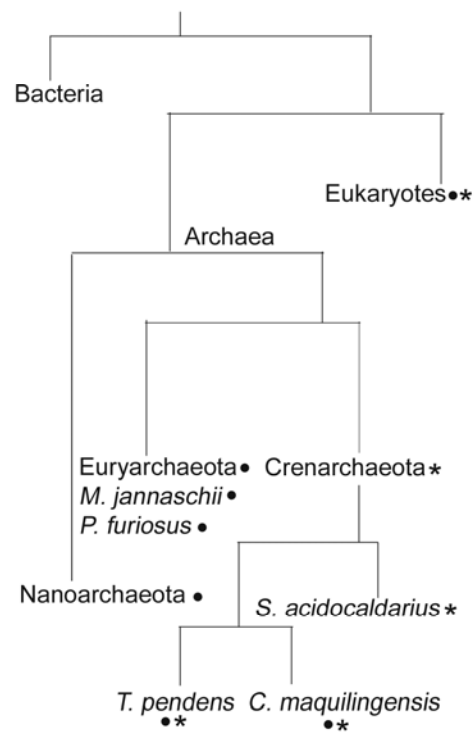


Figure 1. Simplified three-domain phylogenetic tree. The only species indicated are those mentioned in the text. Stars denote the presence of an Rbp8/RpoG gene product. Dots indicate the presence of eukaryotic or archaeal histones. Based on Cubonova et al. 2005.

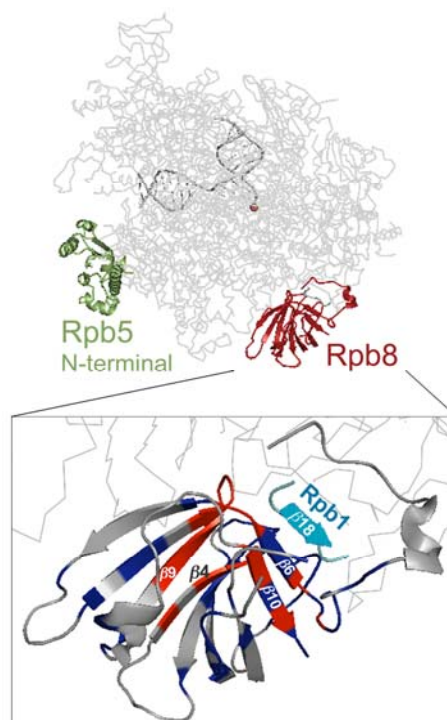


Figure 2. Spatial organization of Rpb8 and of the eukaryotic-specific domain of Rpb5 in the yeast RNA polymerase II crystal structure. Figure based on the 2NVZ PDB file (Wang et al. 2006) and prepared with the Pymol software (<http://pymol.sourceforge.net/>). Upper panel: whole RNA polymerase II structure, emphasizing the secondary structure of Rpb8 and Rpb5 (first 142 amino acids). Lower panel: secondary structures of Rpb8. Conserved positions are shown in blue (in Eukaryotes only) and red (in Eukaryotes and Archaea) and correspond to the alignments shown as Supplementary Material. The Rpb1-β18 sheet is shown in cyan, and corresponds to the conserved $_{563}\text{PAIIKP}_{568}$ motif.

Table 1. Conservation of the core subunits of bacterial, archaeal, eukaryotic and viral RNA polymerases.

Bacteria Chloroplasts	Archaea		Eukaryotes			DNA viruses
	Euryarchaeota Nanorchaeota	Crenarchaeota	Pol II	Pol I	Pol III	EHV86
<i>β'</i>	RpoA',	RpoA', RpoA''	Rpb1	Rpa190	Rpc160	+
<i>β</i>	RpoA'' RpoB	RpoB', RpoB''	Rpb2	Rpa35	Rpc128	+
<i>α</i>	RpoD	RpoD	Rpb3	Rpc40	Rpc40	+
<i>α</i>	RpoL	RpoL	Rpb11	Rpc19	Rpc19	+
<i>ω</i>	RpoK	RpoK	Rpb6	Rpb6	Rpb6	+
	RpoF	RpoF	Rpb4	Rpa14	Rpc17	
	RpoH	RpoH	Rpb5	Rpb5	Rpb5	+
	RpoE'	RpoE'	Rpb7	Rpa43	Rpc25	
	RpoM	RpoM	Rpb9	Rpa12	Rpc11	
	RpoN	RpoN	Rpb10	Rpb10	Rpb10	+
	RpoP	RpoP	Rpb12	Rpb12	Rpb12	
		RpoG	Rpb8	Rpb8	Rpb8	+

LITERATURE CITED

- Briand, J. F., F. Navarro, P. Rematier, C. Boschiero, S. Labarre, M. Werner, G. V. Shpakovski, and P. Thuriaux. 2001. Partners of Rpb8p, a small subunit shared by yeast RNA polymerases I, II and III. *Mol Cell Biol* **21**:6056-6065.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase at 2.8 Å resolution. *Science* **292**:1863-1876.
- Cubonova, L., K. Sandman, S. J. Hallam, E. F. Delong, and J. N. Reeve. 2005. Histones in crenarchaea. *J Bacteriol* **187**:5482-5485.
- Goede, B., S. Naji, O. von Kampen, K. Ilg, and M. Thomm. 2006. Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors. *J Biol Chem* **281**:30581-30592.
- Langer, D., J. Hain, P. Thuriaux, and W. Zillig. 1995. Transcription in Archaea: similarity to that in Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**:5768-5772.
- Proshkina, G. M., E. K. Shematorova, S. A. Proshkin, C. Zaros, P. Thuriaux, and G. V. Shpakovski. 2006. Ancient origin and fast evolution of DNA-dependant RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **34**:3615-3624.
- Reeve, J. N. 2003. Archaeal chromatin and transcription. *Mol Microbiol* **48**:587-598.
- Schaffer, A. A., L. Aravind, T. L. Madden, S. Shavirin, J. L. Spouge, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, and S. F. Altschul. 2001. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Res* **29**:2994-3005.
- Shpakovski, G. V., O. Gadai, S. Labarre-Mariotte, E. N. Lebedenko, I. Miklos, H. Sakurai, S. A. Proshkin, V. Van Mullem, A. Ishihama, and P. Thuriaux. 2000. Functional Conservation of RNA Polymerase II in Fission and Budding Yeasts. *Journal of Molecular Biology* **295**:1119-1127.
- Voutsina, A., M. Riva, C. Carles, and D. Alexandraki. 1999. Sequence divergence of the RNA polymerase shared subunit ABC14.5 (Rpb8) selectively affects RNA polymerase III assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **27**:1047-1055.
- Wang, D., D. A. Bushnell, K. D. Westover, C. D. Kaplan, and R. D. Kornberg. 2006. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* **127**:941-954.
- Werner, F., and R. O. Weinzierl. 2002. A Recombinant RNA Polymerase II-like Enzyme Capable of Promoter- Specific Transcription. *Mol Cell* **10**:635-646.
- Wilson, W. H., D. C. Schroeder, M. J. Allen, M. T. Holden, J. Parkhill, B. G. Barrell, C. Churcher, N. Hamlin, K. Mungall, H. Norbertczak, M. A. Quail, C. Price, E. Rabinowitsch, D. Walker, M. Craigon, D. Roy, and P. Ghazal. 2005. Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a Coccolithovirus. *Science* **309**:1090-1092.
- Woychik, N. A., S. M. Liao, P. A. Kolodziej, and R. A. Young. 1990. Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* **4**:313-323.
- Zaros, C., J. F. Briand, Y. Boulard, S. Labarre-Mariotte, C. Garcia-Lopez, P. Thuriaux, and F. Navarro. 2007. Functional organisation of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **35**:634-647.

Supplementary Material 1. Sequence conservation between Rpb8 and RpoG. Alignments are shown for *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, Virus 86 of the alga *Emiliana Huxleyi* (EHV86) and *Sulfolobus acidocaldarius*. They were based on the following groups of conserved amino acids: AG, CS, DE, DN, EQ, FWY, ILMV, KR, NQ and ST. Conservation found restricted to Eukaryotes and to the viral gene product are shown in blue. Conservation extending to Archaea is in red. The amino acid motifs corresponding to the ten β sheets of Rpb8 were taken from Cramer, Bushnell, and Kornberg (2001).

		$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	
<i>S. cerevisiae</i>	4	LFDDIFQVSEVDPG---	RYNKVCR	IEAASTTQDQCKLTLDINVELFPVAAQDSLVTIASSLNLEDTPA-NDSSATRSWRPPQAGDRSL			
<i>H. sapiens</i>	4	LFEDIFDVKDIDPE-GKKFDRVSR	LHCESEFK-MDL	LIDVNIQIYPVDLGDKFRLVIAS	TLYEDGTLD-----	DGEYNPTDDRPSR	
EHV86	1	MLDMDTNTYNVTEVEPVNAH	ILRCTLVNADSTII	IDINNELFPLSLGDTIDVSHT	-----		
<i>S. acidocaldarius</i>	6	CKISSIEKGALKNLYVVK-MDCDNDLK	IEFDITKEL	SIFSKDEEVTFIISREKPEYS	-----		
		$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$	$\beta 9$	$\beta 10$	
<i>S. cerevisiae</i>		ADDYDVMYGT-----	AYKFEEVSKDLIAVYY	SFGGLLMRLGN---	YRNLNKQENAYLL	IRR	146
<i>H. sapiens</i>		ADQFEYVMYGVYRIEGDET	STEATRLSAYVS	YGGLLMRLQGD--	ANLHGFEVDSRVYLL	MKKLAF	150
EHV86		--SPEYEVNYT-----	TITNTNKQLAS	AGGLLVFTPSINAGTTFT	IGLAKVTSNSS	KRSKLV	112
<i>S. acidocaldarius</i>		--EKDFCAGY-----	LFLERQQEDGSFIDEIS	LYGLIVKILSKNGLINSKLF	KMDHVYCV	VKKKA	122

Supplementary Material 2. Conservation of the Rpb1- β 18 motif bound by Rpb8 in yeast RNA polymerase II (Cramer, Bushnell, and Kornberg 2001). Alignments are based on the conserved groups of amino acids listed in Supplementary Material 1, and were only scored if represented in the majority of the sequences considered. Species encoding for an Rpb8-like gene product are indicated in red. The amino acid motifs corresponding to α chains and β sheets were taken from Cramer, Bushnell, and Kornberg (2001), with Rpb1- β 18 shown in red.

<i>N. equitans</i>	512	GLYLLSLKDKIP----	FKDAIQ	LIEYNCKYFGKDKILKLV	EKAKKEGRDYL	TGKEV	563
<i>P. furiosus</i>	507	GGYLLTREGAYF-----	TRDEVEQ	MLMFAGVDITELPE	PKYDENG	NPLWSGKTI	556
<i>M. jannaschii</i>	516	GAYLLTSNYFTK-----	DEATL	ILRSGGIKDELWEP	DKVENG	VPLYSGKKI	560
<i>S. acidocaldarius</i>	505	GAYLLSVKTTLL-----	TVEEVAT	ILGVTD	FVVGELGE-	PAILAPKPYTGKQV	551
<i>A. pernix</i>	524	GAYLLTVKTRLF-----	TKEEVER	LLSVAGYKGD	LPE-	PAILKPEPLWTGKQL	559
<i>H. butylicum</i>	506	GAYLLTSKATLL-----	TQEDVID	LLSAAGYRGE	IPE-	PAILSPKKRWTGKQL	552
<i>P. islandicum</i>	515	GAYILSHKSTFL-----	TKKEVAY	LLGAGKS	VEDPPE-	PAILHPVELWTGKQI	561
		- α 14--	--	α 15 ---	- β 18- - β 19- - α 16		
<i>S. cerevisiae</i> Rpb2	530	GIRKLTLRDTFI-----	ELDQVL	NMLYVVPD	WDGVIPT	PAIIKPKPLWSGKQI	577
<i>H. sapiens</i> Rpb2	544	AVRKFTKRDFVL-----	ERGEVM	NLLMFLST	WDGKVPQ	PAILKPRPLWTGKQI	591
<i>S. cerevisiae</i> Rpa190	676	AGVWLTSKDSFFFTREYQYIYGCIRPEDGHTTRSKIVTL	P	PTIF	KPYPLWTGKQI		731
<i>H. sapiens</i> Rpa190	637	SGASMTTRGCFFTREHY----	MELVYRGL	TDKVG	RVKLLS	PSILKPFPLWTGKQV	685
<i>S. cerevisiae</i> Rpa160	560	GSYLISHKDSFY-----	RATLTQL	LSMMSD	GIEHFDIPP	PAIMKPYPLWTGKQV	609
<i>H. sapiens</i> Rpa160	549	GAYLLTLKDTFF---	DRAKACQII	IASILV	GKDEKIKVRLPP	PTILKPVTLWTGKQI	600
EHV86	548	GAWLMTDPSVFL-----	TRADMLR	FRIFYVKFAN	NGTTLPP	PAISKPKELWTGSQL	602
Vaccinia	464	AAYSLFRIQDL-----	CLDEV	LNILGKYGRK	FDPKGKCKFSGKDI		503
Mimivirus	547	GSYVQTEPDMEI-----	DWRDAMS	IILMSTSV	KLDNDIPKYQNV	SGKFLYSQI	593
Chilo Iridovirus	637	GAYLMSKENNND-ATLTNGEFNDILMVL	TQND	EYNGDVVDY	FLKRKEDVSN	TLKKL	691

BIBLIOGRAPHIE

- Aasland, R., Stewart, A.F., and Gibson, T. 1996. The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem Sci* **21**(3): 87-88.
- Ahn, S.H., Kim, M., and Buratowski, S. 2004. Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* **13**(1): 67-76.
- Allison, L.A., Moyle, M., Shales, M., and Ingles, C.J. 1985. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* **42**(2): 599-610.
- Allison, L.A., Wong, J.K., Fitzpatrick, V.D., Moyle, M., and Ingles, C.J. 1988. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol Cell Biol* **8**(1): 321-329.
- Armache, K.J., Kettenberger, H., and Cramer, P. 2003. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(12): 6964-6968.
- Asturias, F.J. and Kornberg, R.D. 1999. Protein crystallization on lipid layers and structure determination of the RNA polymerase II transcription initiation complex. *J Biol Chem* **274**(11): 6813-6816.
- Bachant, J.B. and Elledge, S.J. 1999. Mitotic treasures in the nucleolus. *Nature* **398**(6730): 757-758.
- Balajee, A.S., May, A., Dianov, G.L., Friedberg, E.C., and Bohr, V.A. 1997. Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4306-4311.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**(5481): 905-920.

- Battista, J.R., Cox, M.M., Daly, M.J., Narumi, I., Radman, M., and Sommer, S. 2003. The structure of *D. radiodurans*. *Science* **302**(5645): 567-568; author reply 567-568.
- Bazett-Jones, D.P., Leblanc, B., Herfort, M., and Moss, T. 1994. Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**(5162): 1134-1137.
- Bell, S.D., Brinkman, A.B., van der Oost, J., and Jackson, S.P. 2001. The archaeal TFIIE α homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Rep* **2**(2): 133-138.
- Bell, S.P., Jantzen, H.M., and Tjian, R. 1990. Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter selectivity. *Genes Dev* **4**(6): 943-954.
- Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H.M., and Tjian, R. 1988. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* **241**(4870): 1192-1197.
- Bentley, D. 2002. The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr Opin Cell Biol* **14**(3): 336-342.
- Berger AB, Decourty L, Badis G, Nehrbass U, Jacquier A, Gadal O. 2007. Hmo1 Is Required for TOR-Dependent Regulation of Ribosomal Protein Gene Transcription. *Mol Cell Biol* **27**(22):8015-8026.
- Berthiau, A.S., Yankulov, K., Bah, A., Revardel, E., Luciano, P., Wellinger, R.J., Geli, V., and Gilson, E. 2006. Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. *Embo J* **25**(4): 846-856.
- Bianchi, M.E., Beltrame, M., and Paonessa, G. 1989. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science* **243**(4894 Pt 1): 1056-1059.
- Bischler, N., Brino, L., Carles, C., Riva, M., Tschochner, H., Mallouh, V., and Schultz, P. 2002. Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *Embo J* **21**(15): 4136-4144.

- Bodem, J., Dobрева, G., Hoffmann-Rohrer, U., Iben, S., Zentgraf, H., Delius, H., Vingron, M., and Grummt, I. 2000. TIF-IA, the factor mediating growth-dependent control of ribosomal RNA synthesis, is the mammalian homolog of yeast Rrn3p. *EMBO Rep* **1**(2): 171-175.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 574-585.
- Bortvin, A. and Winston, F. 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* **272**(5267): 1473-1476.
- Boukhgalter, B., Liu, M., Guo, A., Tripp, M., Tran, K., Huynh, C., and Pape, L. 2002. Characterization of a fission yeast subunit of an RNA polymerase I essential transcription initiation factor, SpRrn7h/TAF(I)68, that bridges yeast and mammals: association with SpRrn11h and the core ribosomal RNA gene promoter. *Gene* **291**(1-2): 187-201.
- Bradsher, J., Auriol, J., Proietti de Santis, L., Iben, S., Vonesch, J.L., Grummt, I., and Egly, J.M. 2002. CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* **10**(4): 819-829.
- Bréant, B., Huet, J., Sentenac, A., and Fromageot, P. 1983. Analysis of yeast RNA polymerases with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem* **258**(19): 11968-11973.
- Brun, I., Sentenac, A., and Werner, M. 1997. Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *Embo J* **16**(18): 5730-5741.
- Buhler, J.M., Huet, J., Davies, K.E., Sentenac, A., and Fromageot, P. 1980. Immunological studies of yeast nuclear RNA polymerases at the subunit level. *J Biol Chem* **255**(20): 9949-9954.
- Buhler, J.M., Sentenac, A., and Fromageot, P. 1974. Isolation, structure, and general properties of yeast ribonucleic acid polymerase A (or I). *J Biol Chem* **249**(18): 5963-5970.
- Buratowski, S. 2003. The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**(9): 679-680.

- Bushnell, D.A., Westover, K.D., Davis, R.E., and Kornberg, R.D. 2004. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II-TFIIB cocrystal at 4.5 Angstroms. *Science* **303**(5660): 983-988.
- Buttgereit, D., Pflugfelder, G., and Grummt, I. 1985. Growth-dependent regulation of rRNA synthesis is mediated by a transcription initiation factor (TIF-IA). *Nucleic Acids Res* **13**(22): 8165-8180.
- Carles, C., Treich, I., Bouet, F., Riva, M., and Sentenac, A. 1991. Two additional common subunits, ABC10 alpha and ABC10 beta, are shared by yeast RNA polymerases. *J Biol Chem* **266**(35): 24092-24096.
- Carles, C.M.R. 1998. Yeast RNA polymerase I Subunits and Genes. *Transcription of ribosomal RNA genes by Eukaryotic RNA Polymerase I*.
- Carmen, A.A. and Holland, M.J. 1994. The upstream repression sequence from the yeast enolase gene ENO1 is a complex regulatory element that binds multiple trans-acting factors including REB1. *J Biol Chem* **269**(13): 9790-9797.
- Cassuto, E., Lash, T., Sriprakash, K.S., and Radding, C.M. 1971. Role of exonuclease and protein of phage lambda in genetic recombination. V. Recombination of lambda DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(7): 1639-1643.
- Cavalli, G., Bachmann, D., and Thoma, F. 1996. Inactivation of topoisomerases affects transcription-dependent chromatin transitions in rDNA but not in a gene transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* **15**(3): 590-597.
- Cavanaugh, A.H., Hirschler-Laszkiewicz, I., Hu, Q., Dundr, M., Smink, T., Misteli, T., and Rothblum, L.I. 2002. Rrn3 phosphorylation is a regulatory checkpoint for ribosome biogenesis. *J Biol Chem* **277**(30): 27423-27432.
- Chamberlin, M.B., P. 1962. Deoxyribonucleic acid-directed synthesis of ribonucleic acid by an enzyme from Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 81-93.

- Chédin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A., and Carles, C. 1998. The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIS-like subunit and is important for transcription termination. *Genes Dev* **12**(24): 3857-3871.
- Cheetham, G.M. and Steitz, T.A. 2000. Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **10**(1): 117-123.
- Cho, E.J., Rodriguez, C.R., Takagi, T., and Buratowski, S. 1998. Allosteric interactions between capping enzyme subunits and the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **12**(22): 3482-3487.
- Chung, W.H., Craighead, J.L., Chang, W.H., Ezeokonkwo, C., Bareket-Samish, A., Kornberg, R.D., and Asturias, F.J. 2003. RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell* **12**(4): 1003-1013.
- Cismowski, M.J., Laff, G.M., Solomon, M.J., and Reed, S.I. 1995. KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Mol Cell Biol* **15**(6): 2983-2992.
- Clos, J., Buttgerit, D., and Grummt, I. 1986. A purified transcription factor (TIF-IB) binds to essential sequences of the mouse rDNA promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(3): 604-608.
- Closs, C. and Kempe, P. 1986. [A differential view and validation of the life-satisfaction construct: an analysis of proven procedures and recommendations for a methodologically based approach in measuring the dimensions of this construct]. *Z Gerontol* **19**(1): 47-55.
- Coelho, P.S., Bryan, A.C., Kumar, A., Shadel, G.S., and Snyder, M. 2002. A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes Dev* **16**(21): 2755-2760.

- Colbert, T. and Hahn, S. 1992. A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* **6**(10): 1940-1949.
- Comai, L., Tanese, N., and Tjian, R. 1992. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* **68**(5): 965-976.
- Comai, L., Zomerdijk, J.C., Beckmann, H., Zhou, S., Admon, A., and Tjian, R. 1994. Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science* **266**(5193): 1966-1972.
- Conaway, J.W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R.C. 2000. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **25**(8): 375-380.
- Conconi, A., Bessalov, V.A., and Smerdon, M.J. 2002. Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 649-654.
- Corden, J.L., Cadena, D.L., Ahearn, J.M., Jr., and Dahmus, M.E. 1985. A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 7934-7938.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R., and Kornberg, R.D. 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* **288**(5466): 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* **292**(5523): 1863-1876.
- Darst, S.A., Kubalek, E.W., Edwards, A.M., and Kornberg, R.D. 1991. Two-dimensional and epitaxial crystallization of a mutant form of yeast RNA polymerase II. *J Mol Biol* **221**(1): 347-357.

- Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.A. 2002. Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* **10**(2): 409-415.
- De Carlo, S., Carles, C., Riva, M., and Schultz, P. 2003. Cryo-negative staining reveals conformational flexibility within yeast RNA polymerase I. *J Mol Biol* **329**(5): 891-902.
- den Dulk, B., Brandsma, J.A., and Brouwer, J. 2005. The Rad4 homologue YDR314C is essential for strand-specific repair of RNA polymerase I-transcribed rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **56**(6): 1518-1526.
- Dequard-Chablat, M., Riva, M., Carles, C., and Sentenac, A. 1991. RPC19, the gene for a subunit common to yeast RNA polymerases A (I) and C (III). *J Biol Chem* **266**(23): 15300-15307.
- Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C., and Daignan-Fornier, B. 2002. Screening the yeast "disruptome" for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* **277**(30): 27036-27044.
- Dianov, G.L., Houle, J.F., Iyer, N., Bohr, V.A., and Friedberg, E.C. 1997. Reduced RNA polymerase II transcription in extracts of cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome cells. *Nucleic Acids Res* **25**(18): 3636-3642.
- Diffley, J.F. and Stillman, B. 1991. A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7864-7868.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A.L., Hunt, D.F., and Baserga, S.J. 2002. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* **417**(6892): 967-970.
- Egly, J.M. 2001. The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS Lett* **498**(2-3): 124-128.

- Evers, R. and Grummt, I. 1995. Molecular coevolution of mammalian ribosomal gene terminator sequences and the transcription termination factor TTF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 5827-5831.
- Fernandez-Tornero, C., Bottcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W., Sentenac, A., Muller, C.W., and Schoehn, G. 2007. Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol Cell* **25**(6): 813-823.
- Ferri, M.L., Peyroche, G., Siaut, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., and Sentenac, A. 2000. A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIB-related domain of TFIIB70. *Mol Cell Biol* **20**(2): 488-495.
- Friedrich, J.K., Panov, K.I., Cabart, P., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2005. TBP-TAF complex SL1 directs RNA polymerase I pre-initiation complex formation and stabilizes upstream binding factor at the rDNA promoter. *J Biol Chem* **280**(33): 29551-29558.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. 2003. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene* **313**: 17-42.
- Gadal, O., Labarre, S., Boschiero, C., and Thuriaux, P. 2002. Hmo1, an HMG-box protein, belongs to the yeast ribosomal DNA transcription system. *Embo J* **21**(20): 5498-5507.
- Gadal, O., Mariotte-Labarre, S., Chedin, S., Quemeneur, E., Carles, C., Sentenac, A., and Thuriaux, P. 1997. A34.5, a nonessential component of yeast RNA polymerase I, cooperates with subunit A14 and DNA topoisomerase I to produce a functional rRNA synthesis machine. *Mol Cell Biol* **17**(4): 1787-1795.
- Gallagher, J.E., Dunbar, D.A., Granneman, S., Mitchell, B.M., Osheim, Y., Beyer, A.L., and Baserga, S.J. 2004. RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev* **18**(20): 2506-2517.

- Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D., and Hurt, E. 1997. Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* **17**(12): 7088-7098.
- Geiduschek, E.P. and Bartlett, M.S. 2000. Engines of gene expression. *Nat Struct Biol* **7**(6): 437-439.
- Geiduschek, E.P. and Kassavetis, G.A. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol* **310**(1): 1-26.
- Gnatt, A.L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. 2001. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* **292**(5523): 1876-1882.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., and Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**(5287): 546, 563-547.
- Gorski, J.J., Pathak, S., Panov, K., Kasciukovic, T., Panova, T., Russell, J., and Zomerdijs, J.C. 2007. A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *Embo J* **26**(6): 1560-1568.
- Granneman, S. and Baserga, S.J. 2005. Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* **17**(3): 281-286.
- Gregory, S.M. and Sweder, K.S. 2001. Deletion of the CSB homolog, RAD26, yields Spt(-) strains with proficient transcription-coupled repair. *Nucleic Acids Res* **29**(14): 3080-3086.
- Grummt, I. 2003. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* **17**(14): 1691-1702.

- Grummt, I., Kuhn, A., Bartsch, I., and Rosenbauer, H. 1986a. A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell* **47**(6): 901-911.
- Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N., and Bachellerie, J.P. 1985. Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer. *Cell* **43**(3 Pt 2): 801-810.
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U., and Ohrlein, A. 1986b. A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell* **45**(6): 837-846.
- Guglielmi, B. and Werner, M. 2002. The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA maturation, not in telomere elongation inhibition. *J Biol Chem* **277**(38): 35712-35719.
- Gunzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L.C., Chung, H.M., Lee, P.T., and Lee, M.G. 2003. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* **2**(3): 542-551.
- Haeusler, R.A. and Engelke, D.R. 2006. Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **34**(17): 4826-4836.
- Hall, D.B., Wade, J.T., and Struhl, K. 2006. An HMG protein, Hmo1, associates with promoters of many ribosomal protein genes and throughout the rRNA gene locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**(9): 3672-3679.
- Haltiner, M.M., Smale, S.T., and Tjian, R. 1986. Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol Cell Biol* **6**(1): 227-235.
- Hanada, K., Song, C.Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K., and Muramatsu, M. 1996. RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar

- transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *Embo J* **15**(9): 2217-2226.
- Harismendy, O., Gendrel, C.G., Soularue, P., Gidrol, X., Sentenac, A., Werner, M., and Lefebvre, O. 2003. Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *Embo J* **22**(18): 4738-4747.
- Hartzog, G.A., Wada, T., Handa, H., and Winston, F. 1998. Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**(3): 357-369.
- Hausner, W., Lange, U., and Musfeldt, M. 2000. Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase. *J Biol Chem* **275**(17): 12393-12399.
- Heix, J., Zomerdijk, J.C., Ravanpay, A., Tjian, R., and Grummt, I. 1997. Cloning of murine RNA polymerase I-specific TAF factors: conserved interactions between the subunits of the species-specific transcription initiation factor TIF-IB/SL1. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(5): 1733-1738.
- Hernandez, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**(7B): 1291-1308.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C. 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* **308**(5718): 118-120.
- Hisatake, K., Nishimura, T., Maeda, Y., Hanada, K., Song, C.Z., and Muramatsu, M. 1991. Cloning and structural analysis of cDNA and the gene for mouse transcription factor UBF. *Nucleic Acids Res* **19**(17): 4631-4637.
- Holstege, F.C., Fiedler, U., and Timmers, H.T. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *Embo J* **16**(24): 7468-7480.
- Holstege, F.C., van der Vliet, P.C., and Timmers, H.T. 1996. Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo J* **15**(7): 1666-1677.

- Huet, J., Buhler, J.M., Sentenac, A., and Fromageot, P. 1975. Dissociation of two polypeptide chains from yeast RNA polymerase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(8): 3034-3038.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A., and Zillig, W. 1983. Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *Embo J* **2**(8): 1291-1294.
- Hurt, E., Luo, M.J., Rother, S., Reed, R., and Strasser, K. 2004. Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 1858-1862.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozak, P., Egly, J.M., and Grummt, I. 2002. TFIIF plays an essential role in RNA polymerase I transcription. *Cell* **109**(3): 297-306.
- Iorio, C., Vialard, J.E., McCracken, S., Lagace, M., and Richardson, C.D. 1998. The late expression factors 8 and 9 and possibly the phosphoprotein p78/83 of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus are components of the virus-induced RNA polymerase. *Intervirology* **41**(1): 35-46.
- Iyer, L.M., Koonin, E.V., and Aravind, L. 2003. Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases. *BMC Struct Biol* **3**: 1.
- Jantzen, H.M., Admon, A., Bell, S.P., and Tjian, R. 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* **344**(6269): 830-836.
- Jantzen, H.M., Chow, A.M., King, D.S., and Tjian, R. 1992. Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with the TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev* **6**(10): 1950-1963.

- Jasiak, A.J., Armache, K.J., Martens, B., Jansen, R.P., and Cramer, P. 2006. Structural biology of RNA polymerase III: subcomplex C17/25 X-ray structure and 11 subunit enzyme model. *Mol Cell* **23**(1): 71-81.
- Jawhari, A., Uhring, M., De Carlo, S., Crucifix, C., Tocchini-Valentini, G., Moras, D., Schultz, P., and Poterszman, A. 2006. Structure and oligomeric state of human transcription factor TFIIE. *EMBO Rep* **7**(5): 500-505.
- Jensen, G.J., Meredith, G., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. 1998. Structure of wild-type yeast RNA polymerase II and location of Rpb4 and Rpb7. *Embo J* **17**(8): 2353-2358.
- Jeong, S.W., Lang, W.H., and Reeder, R.H. 1996. The yeast transcription terminator for RNA polymerase I is designed to prevent polymerase slippage. *J Biol Chem* **271**(27): 16104-16110.
- Jimeno, S., Rondon, A.G., Luna, R., and Aguilera, A. 2002. The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *Embo J* **21**(13): 3526-3535.
- Jones, M.H., Learned, R.M., and Tjian, R. 1988. Analysis of clustered point mutations in the human ribosomal RNA gene promoter by transient expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(3): 669-673.
- Jordan, E.G. 1984. Nucleolar nomenclature. *J Cell Sci* **67**: 217-220.
- Ju, Q.D., Morrow, B.E., and Warner, J.R. 1990. REB1, a yeast DNA-binding protein with many targets, is essential for growth and bears some resemblance to the oncogene myb. *Mol Cell Biol* **10**(10): 5226-5234.
- Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K., and Kokubo, T. 2007. Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*.

- Kedinger, C., Gniazdowski, M., Mandel, J.L., Jr., Gissinger, F., and Chambon, P. 1970. Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun* **38**(1): 165-171.
- Keener, J., Dodd, J.A., Lalo, D., and Nomura, M. 1997. Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13458-13462.
- Keener, J., Josaitis, C.A., Dodd, J.A., and Nomura, M. 1998. Reconstitution of yeast RNA polymerase I transcription in vitro from purified components. TATA-binding protein is not required for basal transcription. *J Biol Chem* **273**(50): 33795-33802.
- Kelleher, R.J., 3rd, Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. 1990. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* **61**(7): 1209-1215.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A., and Beach, D. 1988. Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *Embo J* **7**(5): 1537-1547.
- Kettenberger, H., Armache, K.J., and Cramer, P. 2004. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS. *Mol Cell* **16**(6): 955-965.
- Keys, D.A., Lee, B.S., Dodd, J.A., Nguyen, T.T., Vu, L., Fantino, E., Burson, L.M., Nogi, Y., and Nomura, M. 1996. Multiprotein transcription factor UAF interacts with the upstream element of the yeast RNA polymerase I promoter and forms a stable preinitiation complex. *Genes Dev* **10**(7): 887-903.
- Keys, D.A., Vu, L., Steffan, J.S., Dodd, J.A., Yamamoto, R.T., Nogi, Y., and Nomura, M. 1994. RRN6 and RRN7 encode subunits of a multiprotein complex essential for the initiation of rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**(19): 2349-2362.

- Klinger, C., Huet, J., Song, D., Petersen, G., Riva, M., Bautz, E.K., Sentenac, A., Oudet, P., and Schultz, P. 1996. Localization of yeast RNA polymerase I core subunits by immunoelectron microscopy. *Embo J* **15**(17): 4643-4653.
- Kolodrubetz, D. and Burgum, A. 1990. Duplicated NHP6 genes of *Saccharomyces cerevisiae* encode proteins homologous to bovine high mobility group protein 1. *J Biol Chem* **265**(6): 3234-3239.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14**(19): 2452-2460.
- Kornberg, R.D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32): 12955-12961.
- Kuhn, A., Bartsch, I., and Grummt, I. 1990. Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases. *Nature* **344**(6266): 559-562.
- Kuhn, A., Voit, R., Stefanovsky, V., Evers, R., Bianchi, M., and Grummt, I. 1994. Functional differences between the two splice variants of the nucleolar transcription factor UBF: the second HMG box determines specificity of DNA binding and transcriptional activity. *Embo J* **13**(2): 416-424.
- Kulkens, T., van der Sande, C.A., Dekker, A.F., van Heerikhuizen, H., and Planta, R.J. 1992. A system to study transcription by yeast RNA polymerase I within the chromosomal context: functional analysis of the ribosomal DNA enhancer and the RBP1/REB1 binding sites. *Embo J* **11**(12): 4665-4674.
- Laferté, A., Favry, E., Sentenac, A., Riva, M., Carles, C., and Chedin, S. 2006. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes Dev* **20**(15): 2030-2040.
- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D. 1998. Birth of the snoRNPs: the evolution of the modification-guide snoRNAs. *Trends Biochem Sci* **23**(10): 383-388.

- Lafontaine, D.L. and Tollervey, D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(7): 514-520.
- Lalo, D., Steffan, J.S., Dodd, J.A., and Nomura, M. 1996. RRN11 encodes the third subunit of the complex containing Rrn6p and Rrn7p that is essential for the initiation of rDNA transcription by yeast RNA polymerase I. *J Biol Chem* **271**(35): 21062-21067.
- Landrieux, E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M., and Carles, C. 2006. A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *Embo J* **25**(1): 118-128.
- Lang, W.H., Morrow, B.E., Ju, Q., Warner, J.R., and Reeder, R.H. 1994. A model for transcription termination by RNA polymerase I. *Cell* **79**(3): 527-534.
- Lang, W.H. and Reeder, R.H. 1993. The REB1 site is an essential component of a terminator for RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**(1): 649-658.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., and Zillig, W. 1995. Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 5768-5772.
- Lanzendorfer, M., Smid, A., Klinger, C., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. 1997. A shared subunit belongs to the eukaryotic core RNA polymerase. *Genes Dev* **11**(8): 1037-1047.
- Learned, R.M., Cordes, S., and Tjian, R. 1985. Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* **5**(6): 1358-1369.
- Learned, R.M., Learned, T.K., Haltiner, M.M., and Tjian, R.T. 1986. Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell* **45**(6): 847-857.
- Learned, R.M., Smale, S.T., Haltiner, M.M., and Tjian, R. 1983. Regulation of human ribosomal RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(12): 3558-3562.

- Leblanc, B., Read, C., and Moss, T. 1993. Recognition of the *Xenopus* ribosomal core promoter by the transcription factor xUBF involves multiple HMG box domains and leads to an xUBF interdomain interaction. *Embo J* **12**(2): 513-525.
- Lee, S.K., Yu, S.L., Prakash, L., and Prakash, S. 2001. Requirement for yeast RAD26, a homolog of the human CSB gene, in elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **21**(24): 8651-8656.
- . 2002. Requirement of yeast RAD2, a homolog of human XPG gene, for efficient RNA polymerase II transcription. implications for Cockayne syndrome. *Cell* **109**(7): 823-834.
- Léger-Silvestre, I., Trumtel, S., Noaillac-Depeyre, J., and Gas, N. 1999. Functional compartmentalization of the nucleus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* **108**(2): 103-113.
- Lehmann, A.R. 2003. DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**(11): 1101-1111.
- Leuther, K.K., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. 1996. Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* **85**(5): 773-779.
- Li, S. and Smerdon, M.J. 2002. Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **21**(21): 5921-5929.
- Liljelund, P., Mariotte, S., Buhler, J.M., and Sentenac, A. 1992. Characterization and mutagenesis of the gene encoding the A49 subunit of RNA polymerase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(19): 9302-9305.
- Lin, C.W., Moorefield, B., Payne, J., Aprikian, P., Mitomo, K., and Reeder, R.H. 1996. A novel 66-kilodalton protein complexes with Rrn6, Rrn7, and TATA-binding protein to promote polymerase I transcription initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**(11): 6436-6443.

- Lindstrom, D.L., Squazzo, S.L., Muster, N., Burckin, T.A., Wachter, K.C., Emigh, C.A., McCleery, J.A., Yates, J.R., 3rd, and Hartzog, G.A. 2003. Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol Cell Biol* **23**(4): 1368-1378.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**(12): 3843-3849.
- Lu, J., Kobayashi, R., and Brill, S.J. 1996. Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast. *J Biol Chem* **271**(52): 33678-33685.
- Mann, C., Buhler, J.M., Treich, I., and Sentenac, A. 1987. RPC40, a unique gene for a subunit shared between yeast RNA polymerases A and C. *Cell* **48**(4): 627-637.
- McStay, B., Frazier, M.W., and Reeder, R.H. 1991. xUBF contains a novel dimerization domain essential for RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* **5**(11): 1957-1968.
- Mémet, S., Gouy, M., Marck, C., Sentenac, A., and Buhler, J.M. 1988. RPA190, the gene coding for the largest subunit of yeast RNA polymerase A. *J Biol Chem* **263**(6): 2830-2839.
- Milkereit, P., Schultz, P., and Tschochner, H. 1997. Resolution of RNA polymerase I into dimers and monomers and their function in transcription. *Biol Chem* **378**(12): 1433-1443.
- Milkereit, P. and Tschochner, H. 1998. A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *Embo J* **17**(13): 3692-3703.
- Miller, G., Panov, K.I., Friedrich, J.K., Trinkle-Mulcahy, L., Lamond, A.I., and Zomerdijs, J.C. 2001. hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *Embo J* **20**(6): 1373-1382.
- Miller, O.L., Jr. and Beatty, B.R. 1969. Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**(882): 955-957.

- Mooney, R.A., Darst, S.A., and Landick, R. 2005. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol Cell* **20**(3): 335-345.
- Moorefield, B., Greene, E.A., and Reeder, R.H. 2000. RNA polymerase I transcription factor Rrn3 is functionally conserved between yeast and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4724-4729.
- Morrow, B.E., Ju, Q., and Warner, J.R. 1993. A bipartite DNA-binding domain in yeast Reb1p. *Mol Cell Biol* **13**(2): 1173-1182.
- Mosrin, C., Riva, M., Beltrame, M., Cassar, E., Sentenac, A., and Thuriaux, P. 1990. The RPC31 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a subunit of RNA polymerase C (III) with an acidic tail. *Mol Cell Biol* **10**(9): 4737-4743.
- Mougey, E.B., O'Reilly, M., Osheim, Y., Miller, O.L., Jr., Beyer, A., and Sollner-Webb, B. 1993a. The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complexes. *Genes Dev* **7**(8): 1609-1619.
- Mougey, E.B., Pape, L.K., and Sollner-Webb, B. 1993b. A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* **13**(10): 5990-5998.
- Murakami, K.S. and Darst, S.A. 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin Struct Biol* **13**(1): 31-39.
- Musters, W., Knol, J., Maas, P., Dekker, A.F., van Heerikhuizen, H., and Planta, R.J. 1989. Linker scanning of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res* **17**(23): 9661-9678.
- Nedialkov, Y.A., Gong, X.Q., Hovde, S.L., Yamaguchi, Y., Handa, H., Geiger, J.H., Yan, H., and Burton, Z.F. 2003. NTP-driven translocation by human RNA polymerase II. *J Biol Chem* **278**(20): 18303-18312.

- Nogi, Y., Vu, L., and Nomura, M. 1991a. An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16): 7026-7030.
- Nogi, Y., Yano, R., and Nomura, M. 1991b. Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9): 3962-3966.
- Nomura, M. 1998. Transcription factors used by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I and the mechanism of initiation. *Transcription of ribosomal RNA genes by Eukaryotic RNA Polymerase I Springer edition*: 155-172.
- Novello, F. and Stirpe, F. 1970. Simultaneous assay of RNA polymerase I and II in nuclei isolated from resting and growing rat liver with the use of alpha-amanitin. *FEBS Lett* **8**(1): 57-60.
- O'Sullivan, A.C., Sullivan, G.J., and McStay, B. 2002. UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol Cell Biol* **22**(2): 657-668.
- Oakes, M., Nogi, Y., Clark, M.W., and Nomura, M. 1993. Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* **13**(4): 2441-2455.
- Oakes, M., Siddiqi, I., Vu, L., Aris, J., and Nomura, M. 1999. Transcription factor UAF, expansion and contraction of ribosomal DNA (rDNA) repeats, and RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA. *Mol Cell Biol* **19**(12): 8559-8569.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Nunes, P.C., Pontes, O., and Pikaard, C.S. 2005. Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* **120**(5): 613-622.
- Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J., and Beyer, A.L. 2004. Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the

- SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **16**(6): 943-954.
- Panov, K.I., Friedrich, J.K., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2006a. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *Embo J* **25**(14): 3310-3322.
- Panov, K.I., Panova, T.B., Gadai, O., Nishiyama, K., Saito, T., Russell, J., and Zomerdijk, J.C. 2006b. RNA polymerase I-specific subunit CAST/hPAF49 has a role in the activation of transcription by upstream binding factor. *Mol Cell Biol* **26**(14): 5436-5448.
- Pederson, T. 1998. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* **26**(17): 3871-3876.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C., and Riva, M. 2000. The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J* **19**(20): 5473-5482.
- Pikaard, C.S., McStay, B., Schultz, M.C., Bell, S.P., and Reeder, R.H. 1989. The *Xenopus* ribosomal gene enhancers bind an essential polymerase I transcription factor, xUBF. *Genes Dev* **3**(11): 1779-1788.
- Piper, P.W., Bellatin, J.A., and Lockheart, A. 1983. Altered maturation of sequences at the 3' terminus of 5S gene transcripts in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant that lacks a RNA processing endonuclease. *Embo J* **2**(3): 353-359.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V., and Lagrange, T. 2005. Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **19**(17): 2030-2040.
- Ponting, C.P. 2002. Novel domains and orthologues of eukaryotic transcription elongation factors. *Nucleic Acids Res* **30**(17): 3643-3652.

- Prescott, E.M., Osheim, Y.N., Jones, H.S., Alen, C.M., Roan, J.G., Reeder, R.H., Beyer, A.L., and Proudfoot, N.J. 2004. Transcriptional termination by RNA polymerase I requires the small subunit Rpa12p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6068-6073.
- Proshkina, G.M., Shematorova, E.K., Proshkin, S.A., Zaros, C., Thuriaux, P., and Shpakovski, G.V. 2006. Ancient origin, functional conservation and fast evolution of DNA-dependent RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **34**(13): 3615-3624.
- Qureshi, S.A., Khoo, B., Baumann, P., and Jackson, S.P. 1995. Molecular cloning of the transcription factor TFIIB homolog from *Sulfolobus shibatae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(13): 6077-6081.
- Reeder, R.H., Guevara, P., and Roan, J.G. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase I terminates transcription at the Reb1 terminator in vivo. *Mol Cell Biol* **19**(11): 7369-7376.
- Remacle, J.E. and Holmberg, S. 1992. A REB1-binding site is required for GCN4-independent ILV1 basal level transcription and can be functionally replaced by an ABF1-binding site. *Mol Cell Biol* **12**(12): 5516-5526.
- Rice, G.A., Chamberlin, M.J., and Kane, C.M. 1993. Contacts between mammalian RNA polymerase II and the template DNA in a ternary elongation complex. *Nucleic Acids Res* **21**(1): 113-118.
- Riva, M., Memet, S., Micouin, J.Y., Huet, J., Treich, I., Dassa, J., Young, R., Buhler, J.M., Sentenac, A., and Fromageot, P. 1986. Isolation of structural genes for yeast RNA polymerases by immunological screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6): 1554-1558.
- Rodriguez, C.R., Cho, E.J., Keogh, M.C., Moore, C.L., Greenleaf, A.L., and Buratowski, S. 2000. Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**(1): 104-112.

- Roeder, R.G. and Rutter, W.J. 1969. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* **224**(5216): 234-237.
- Rondon, A.G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Barrera, S., and Aguilera, A. 2003. Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. *Embo J* **22**(3): 612-620.
- Sarker, A.H., Tsutakawa, S.E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D.S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J.A., Nogales, E., and Cooper, P.K. 2005. Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell* **20**(2): 187-198.
- Schaffrath, R. and Breunig, K.D. 2000. Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* **30**(3): 173-190.
- Schnapp, A., Clos, J., Hadelt, W., Schreck, R., Cvekl, A., and Grummt, I. 1990a. Isolation and functional characterization of TIF-IB, a factor that confers promoter specificity to mouse RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res* **18**(6): 1385-1393.
- Schnapp, A. and Grummt, I. 1991. Transcription complex formation at the mouse rDNA promoter involves the stepwise association of four transcription factors and RNA polymerase I. *J Biol Chem* **266**(36): 24588-24595.
- Schnapp, A., Pfeleiderer, C., Rosenbauer, H., and Grummt, I. 1990b. A growth-dependent transcription initiation factor (TIF-IA) interacting with RNA polymerase I regulates mouse ribosomal RNA synthesis. *Embo J* **9**(9): 2857-2863.
- Schneider, D.A., French, S.L., Osheim, Y.N., Bailey, A.O., Vu, L., Dodd, J., Yates, J.R., Beyer, A.L., and Nomura, M. 2006. RNA polymerase II elongation factors Spt4p and Spt5p play roles in transcription elongation by RNA polymerase I and rRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(34): 12707-12712.
- Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and Nomura, M. 2007. Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol Cell* **26**(2): 217-229.

- Schroeder, S.C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. 2000. Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* **14**(19): 2435-2440.
- Schroeder, S.C., Zorio, D.A., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. 2004. A function of yeast mRNA cap methyltransferase, Abd1, in transcription by RNA polymerase II. *Mol Cell* **13**(3): 377-387.
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., and Egly, J.M. 2000. Molecular structure of human TFIIF. *Cell* **102**(5): 599-607.
- Shpakovski, G. V., and E. K. Shematorova. 1999. [Characteristics of the cDNA of the Schizosaccharomyces pombe rpa43+ gene: structural similarity of the Rpa43 subunit of RNA-polymerase I with the Rpc25 subunit of RNA-polymerase III]. *Bioorg Khim* **25**:791-6.
- Selby, C.P. and Sancar, A. 1997. Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11205-11209.
- Sentenac, A. 1985. Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Crit Rev Biochem* **18**(1): 31-90.
- Sentenac, A. and Hall, B.D. 1982. Yeast nuclear RNA polymerases and their role in transcription. in: *"The molecular biology of the yeast Saccharomyces"*, JN Strathern, EW Jones and JR Broach eds Vol I, 561-606 Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- Shirakawa, H., Tsuda, K., and Yoshida, M. 1990. Primary structure of non-histone chromosomal protein HMG2 revealed by the nucleotide sequence. *Biochemistry* **29**(18): 4419-4423.
- Siddiqi, I., Keener, J., Vu, L., and Nomura, M. 2001a. Role of TATA binding protein (TBP) in yeast ribosomal dna transcription by RNA polymerase I: defects in the dual functions of transcription factor UAF cannot be suppressed by TBP. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2292-2297.

- Siddiqi, I.N., Dodd, J.A., Vu, L., Eliason, K., Oakes, M.L., Keener, J., Moore, R., Young, M.K., and Nomura, M. 2001b. Transcription of chromosomal rRNA genes by both RNA polymerase I and II in yeast *uaf30* mutants lacking the 30 kDa subunit of transcription factor UAF. *Embo J* **20**(16): 4512-4521.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**(6281): 240-244.
- Smid, A., Riva, M., Bouet, F., Sentenac, A., and Carles, C. 1995. The association of three subunits with yeast RNA polymerase is stabilized by A14. *J Biol Chem* **270**(22): 13534-13540.
- Stefanovsky, V., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I., and Moss, T. 2006. Growth factor signaling regulates elongation of RNA polymerase I transcription in mammals via UBF phosphorylation and r-chromatin remodeling. *Mol Cell* **21**(5): 629-639.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Bazett-Jones, D.P., Crane-Robinson, C., and Moss, T. 2001. DNA looping in the RNA polymerase I enhancesome is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules. *Nucleic Acids Res* **29**(15): 3241-3247.
- Steffan, J.S., Keys, D.A., Dodd, J.A., and Nomura, M. 1996. The role of TBP in rDNA transcription by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae*: TBP is required for upstream activation factor-dependent recruitment of core factor. *Genes Dev* **10**(20): 2551-2563.
- Steffan, J.S., Keys, D.A., Vu, L., and Nomura, M. 1998. Interaction of TATA-binding protein with upstream activation factor is required for activated transcription of ribosomal DNA by RNA polymerase I in *Saccharomyces cerevisiae* in vivo. *Mol Cell Biol* **18**(7): 3752-3761.

- Swanson, M.S., Malone, E.A., and Winston, F. 1991. SPT5, an essential gene important for normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat. *Mol Cell Biol* **11**(8): 4286.
- Thiry, M. and Lafontaine, D.L. 2005. Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* **15**(4): 194-199.
- Thompson, M., Haeusler, R.A., Good, P.D., and Engelke, D.R. 2003. Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science* **302**(5649): 1399-1401.
- Thuillier, V., Brun, I., Sentenac, A., and Werner, M. 1996. Mutations in the alpha-amanitin conserved domain of the largest subunit of yeast RNA polymerase III affect pausing, RNA cleavage and transcriptional transitions. *Embo J* **15**(3): 618-629.
- Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P., and Werner, M. 1995. A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *Embo J* **14**(2): 351-359.
- Thuriaux, P., Mariotte, S., Buhler, J.M., Sentenac, A., Vu, L., Lee, B.S., and Nomura, M. 1995. Gene RPA43 in *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential subunit of RNA polymerase I. *J Biol Chem* **270**(41): 24252-24257.
- Tijsterman, M., Verhage, R.A., van de Putte, P., Tasseront-de Jong, J.G., and Brouwer, J. 1997. Transitions in the coupling of transcription and nucleotide excision repair within RNA polymerase II-transcribed genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8027-8032.
- Tommasino, M., Ricci, S., and Galeotti, C.L. 1988. Genome organization of the killer plasmid pGK12 from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res* **16**(13): 5863-5878.
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C., and Grosschedl, R. 1991. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev* **5**(5): 880-894.

- Treich, I., Carles, C., Riva, M., and Sentenac, A. 1992. RPC10 encodes a new mini subunit shared by yeast nuclear RNA polymerases. *Gene Expr* **2**(1): 31-37.
- Trumtel, S., Léger-Silvestre, I., Gleizes, P.E., Teulieres, F., and Gas, N. 2000. Assembly and functional organization of the nucleolus: ultrastructural analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *Mol Biol Cell* **11**(6): 2175-2189.
- Udem, S.A. and Warner, J.R. 1972. Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **65**(2): 227-242.
- Valenzuela, P., Bell, G.I., Weinberg, F., and Rutter, W.J. 1976. Yeast DNA dependent RNA polymerases I, II and III. The existence of subunits common to the three enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* **71**(4): 1319-1325.
- Van Mullem, V., Landrieux, E., Vandenhaute, J., and Thuriaux, P. 2002. Rpa12p, a conserved RNA polymerase I subunit with two functional domains. *Mol Microbiol* **43**(5): 1105-1113.
- Van Mullem, V., Wery, M., De Bolle, X., and Vandenhaute, J. 2003. Construction of a set of *Saccharomyces cerevisiae* vectors designed for recombinational cloning. *Yeast* **20**(8): 739-746.
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., and Yokoyama, S. 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**(6890): 712-719.
- Vogelauer, M., Cioci, F., and Camilloni, G. 1998. DNA protein-interactions at the *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA promoter and in its surrounding region. *J Mol Biol* **275**(2): 197-209.
- Vu, L., Siddiqi, I., Lee, B.S., Josaitis, C.A., and Nomura, M. 1999. RNA polymerase switch in transcription of yeast rDNA: role of transcription factor UAF (upstream activation factor) in silencing rDNA transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4390-4395.

- Wagner, C.R., Hamana, K., and Elgin, S.C. 1992. A high-mobility-group protein and its cDNAs from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **12**(5): 1915-1923.
- Wang, H., Nicholson, P.R., and Stillman, D.J. 1990. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* DNA-binding protein involved in transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* **10**(4): 1743-1753.
- Warner, J.R. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**(11): 437-440.
- Weir, H.M., Kraulis, P.J., Hill, C.S., Raine, A.R., Laue, E.D., and Thomas, J.O. 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *Embo J* **12**(4): 1311-1319.
- Weiss, S.a.G., L. 1959. A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid. *Journal of American Chemical Society* **81**: 4118-4119.
- Werner, F. and Weinzierl, R.O. 2002. A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell* **10**(3): 635-646.
- Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A., and Thuriaux, P. 1992. Effect of mutations in a zinc-binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association. *Mol Cell Biol* **12**(3): 1087-1095.
- Westover, K.D., Bushnell, D.A., and Kornberg, R.D. 2004a. Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell* **119**(4): 481-489.
- . 2004b. Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II. *Science* **303**(5660): 1014-1016.
- Wilson, D.W. and Meacock, P.A. 1988. Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid-encoded RNA polymerase of unique structure. *Nucleic Acids Res* **16**(16): 8097-8112.

- Woychik, N.A., Liao, S.M., Kolodziej, P.A., and Young, R.A. 1990. Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes Dev* **4**(3): 313-323.
- Woychik, N.A. and Young, R.A. 1990. RNA polymerase II subunit RPB10 is essential for yeast cell viability. *J Biol Chem* **265**(29): 17816-17819.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F., and Schultz, P. 2004. Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell* **15**(2): 199-208.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.C., Dufour, M.E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., Libri, D., and Jacquier, A. 2005. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell* **121**(5): 725-737.
- Yamamoto, R.T., Nogi, Y., Dodd, J.A., and Nomura, M. 1996. RRN3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an essential RNA polymerase I transcription factor which interacts with the polymerase independently of DNA template. *Embo J* **15**(15): 3964-3973.
- Yang, C.H., Lambie, E.J., Hardin, J., Craft, J., and Snyder, M. 1989. Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma* **98**(2): 123-128.
- Young, R.A. and Davis, R.W. 1983. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science* **222**(4625): 778-782.
- Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U., and Grummt, I. 2002. Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep* **3**(11): 1082-1087.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H., and Noller, H.F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**(5518): 883-896.

- Zahradka, K., Slade, D., Bailone, A., Sommer, S., Averbek, D., Petranovic, M., Lindner, A.B., and Radman, M. 2006. Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature* **443**(7111): 569-573.
- Zaros, C., Briand, J.F., Boulard, Y., Labarre-Mariotte, S., Garcia-Lopez, M.C., Thuriaux, P., and Navarro, F. 2007. Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **35**(2): 634-647.
- Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S., and Greenleaf, A.L. 1988. The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(11): 3698-3702.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., and Darst, S.A. 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* **98**(6): 811-824.
- Zomerdijs, J.C., Beckmann, H., Comai, L., and Tjian, R. 1994. Assembly of transcriptionally active RNA polymerase I initiation factor SL1 from recombinant subunits. *Science* **266**(5193): 2015-2018.
- Zorio, D.A. and Bentley, D.L. 2004. The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways. *Exp Cell Res* **296**(1): 91-97.

ABSTRACT

Rpa34 and Rpa49 are non-catalytic subunits of RNA polymerase I (Pol I) conserved from yeast to man. Rpa34 binds a conserved domain between positions 63 and 119 of Rpa49 and this stabilises Rpa49 onto Pol I. Conversely, the *rpa49-119,416* N-terminal deletion, with no binding domain, fails to recruit Rpa34 onto Pol I. *rpa34Δ* grows like a wild type but is synthetic lethal with *top1Δ* (lacking a type I DNA topoisomerase) and with *rpa135-L656P* or *rpa135-D398N*, two viable but mycophenolate-sensitive Pol I mutants. These defects are suppressed by over-expressing Rpa49, further arguing for a close functional interaction between Rpa34 and Rpa49. *in vivo*, Rpa49 is critical for regulating the binding and release of Rrn3 during initiation and elongation. *rpa49Δ* (or an *rpa49::HIS3* mutant lacking the conserved C-terminal end of Rpa49) partly impairs the recruitment of Rrn3 to the rDNA promoter, but this defect is bypassed by the *rpa43 35,326* N-terminal deletion. These *rpa49* mutants are also unable to release the Rrn3 initiation factor from the elongating Pol I, and fully dissociate the elongating Pol I from its rDNA template. Rpa49, combined with Rpa34, therefore appears to facilitate Pol I recruitment and to convert it into an elongation-competent form lacking Rrn3.

RESUME

Rpa34 et Rpa49 sont deux sous-unités non-catalytiques de l'ARN polymérase I (Pol I) conservées de la levure à l'homme. Rpa34 s'associe au domaine N-terminal (entre les positions 63 et 119) de Rpa49. Cette fixation stabiliserait Rpa49. La délétion du domaine N-terminal de Rpa49 (*rpa49-119,416*) abolit l'association de Rpa34 avec l'ARN polymérase I. La mutation *rpa34Δ* ne provoque pas de défauts de croissance. Cependant Rpa34 devient indispensable avec *top1Δ* et avec *rpa135-L656P* ou *rpa135-D398N* deux mutants qui sont sensibles au mycophénolate. Néanmoins, ces défauts sont supprimés par la surexpression de Rpa49, renforçant ainsi l'idée que Rpa34 s'associe à Rpa49. Rpa49 est critique pour la fixation et la dissociation de Rrn3 lors des étapes d'initiation et d'élongation. *rpa49Δ* (ou la délétion du domaine conservé C-terminal dans le mutant *rpa49::HIS3*) diminue le recrutement de Rrn3 sur le promoteur. Cependant, cet effet est supprimé par la délétion du domaine N-terminal de Rpa43. Les mutants *rpa49* sont également incapables de libérer complètement Rrn3 durant la transition entre l'initiation et l'élongation de la transcription. Le dimère Rpa49/Rpa34 facilite donc le recrutement de l'ARN polymérase I et la conversion de l'ARN polymérase I dans une forme compétente pour élongation.